

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS - CCAE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**MARCELLE TEMPORIM NOVAES**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA *in vitro* DO  
CITRAL E DOS ÓLEOS ESSENCIAIS *Cymbopogon citratus* E *Cymbopogon  
wynterianus* SOBRE ADULTOS DE *Fasciola hepatica***

**ALEGRE-ES**

**2017**

MARCELLE TEMPORIM NOVAES

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA *in vitro* DO  
CITRAL E DOS ÓLEOS ESSENCIAIS *Cymbopogon citratus* E *Cymbopogon  
wynterianus* SOBRE ADULTOS DE *Fasciola hepatica***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - CCAE da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em (Diagnóstico e terapêutica das enfermidades cirúrgicas).  
Orientador: Prof. Dr. Vagner Tebaldi de Queiroz  
Co-Orientadora: Prof.<sup>a</sup>.Dr.<sup>a</sup> Isabella Vilhena Freire Martins

ALEGRE-ES

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial Sul, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

Novaes, Marcelle Temporim, 1992

N935c      Caracterização química e atividade anti-helmíntica in vitro do citral e dos óleos essenciais *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon wynterianus* sobre adultos de *Fasciola hepática* / Marcelle Temporim Novaes. – 2017.

50 f. : il.

Orientador: Vagner Tebaldi de Queiroz.

Coorientador: Isabella Vilhena Freire Martins.

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. *Fasciola hepática*. 2. Produtos naturais. 3. Trematodeo. I. Queiroz, Vagner Tebaldi de. II. Martins, Isabella Vilhena Freire. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. IV. Título.

CDU: 619

---

MARCELLE TEMPORIM NOVAES

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA *in vitro* DO  
CITRAL E DOS ÓLEOS ESSENCIAIS *Cymbopogon citratus* E *Cymbopogon  
wynterianus* SOBRE ADULTOS DE *Fasciola hepatica***

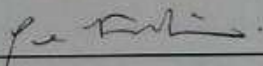
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - CCAE da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em diagnóstico e terapêutica das enfermidades clínico-cirúrgicas.

Aprovado em 31 de julho de 2017.

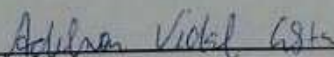
**COMISSÃO EXAMINADORA**



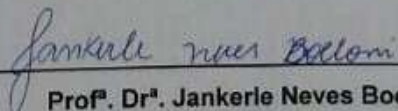
**Prof. Dr. Vagner Tebaldi de Queiroz**  
Orientador



**Prof. Dr. Isabella Vilhena Freire Martins**  
Co-orientadora



**Prof. Dr. Adilson Vidal Costa**  
Universidade Federal do Espírito Santo



**Prof. Dr. Jankerle Neves Boeloni**  
Universidade Federal do Espírito Santo

Dedico esta dissertação a Deus, aos  
meus pais Edna e Aristides e a minha avó  
Nilza Odila.

## **AGRADECIMENTOS**

Àquele que é onipotente, onipresente e onisciente o Senhor Jesus que nunca me desamparou e que providenciou cada detalhe da minha vida, abrindo as melhores portas e na hora certa.

Ao meu orientador Vagner de Queiroz e a minha coorientadora Isabella Martins e os professores Adilson Costa e Jankerle Boeloni que estiveram sempre dispostos a me ajudar ao longo do projeto, e a todos os professores que tive ao longo da minha vida, pois sem eles não teria o conhecimento que tenho hoje. As minhas amigas do laboratório de Química Natália Guedes e Milena Fazolo, e aos meus amigos do laboratório Maria Larissa Vidal, Larice Marques, Winner Duque, Luiz Filippe Soares e Roselena Guedes que muito se envolveram na realização do projeto. As técnicas do laboratório mais eficientes que já conheci que sempre estiveram dispostas a me auxiliar com os materiais que faltavam Jerusa Santana, Sandra Cristina e Magda Lugon. Aos supervisores Rosemberg Candido e Romenick Polastreli e aos vigias Edimar do Vale e Marcelo Chaves que sempre disponibilizaram a sua imensa simpatia e segurança.

Aos meus pais Aristides Novaes e Edna Novaes pela compreensão, carinho e pelo apoio, e também aos meus tios Wallace Lomba e Sônia Scantamburlo e suas filhas Cristine, Carine e Caroline que sempre me incentivaram a estudar desde quando eu era criança. Ao Alexandre Sabino que disponibilizou seu tempo para me levar nas coletas do projeto e, além disso, sempre me apoiou em cada etapa do mestrado.

Aos meus queridos amigos Fernanda Roldi e Deivid França que muito me ensinaram com suas experiências de vida e acadêmica. As minhas amigas maravilhosas Daiane Martins, Tatiane Cabalini, Ana Lovatti, Eliane Faria e Silvana Faria que muito oraram e me escutaram ao longo desses dois anos de jornada. A Gisele Bitencourt que muitas vezes deixou os seus afazeres para trazer as amostras para o projeto. A UFES e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, por disponibilizarem o espaço físico e o corpo docente. A CAPES e a FAPES por todo apoio financeiro.

“Porque tú ó Deus tem sido a fortaleza do pobre, a fortaleza do necessitado na sua angústia, refúgio contra a tempestade, e sombra contra o calor, pois o assopro dos violentos é como a tempestade contra o muro”.

Bíblia Sagrada, Isaías 25:4

## RESUMO

TEMPORIM NOVAES, MARCELLE. **Caracterização química e atividade anti-helmíntica *in vitro* do citral e dos óleos essenciais *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon wynterianus* sobre adultos de *Fasciola hepatica***. 2017. 50p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2017.

O parasito *Fasciola hepatica* é um trematódeo que acomete o fígado de bovinos, ovinos, animais silvestres e humanos. É responsável por grandes perdas econômicas em diversos países. A resistência em *F. hepatica*, principalmente ao triclabendazol, tem estimulado a busca de produtos alternativos para a fasciolose. Diante disto, objetivou-se com este estudo avaliar a atividade do óleo essencial (OE) de *Cymbopogon citratus* (capim-limão) e de seus componentes majoritários citral (neral + geranial) bem como do OE de *Cymbopogon wynterianus* (citronela) nas concentrações 0,025%, 0,05% e 0,1% ( $\text{m v}^{-1}$ ) sobre parasitos adultos de *F. hepatica*. Os OEs foram extraídos utilizando um aparelho do tipo Clevenger e o citral foi obtido comercialmente e estes foram caracterizados por cromatografia gasosa (CG-DIC e CG-EM). Foram utilizados oito adultos de *F. hepatica* para cada grupo em placas de Petri individuais e estas foram analisadas após três, doze e quinze horas, sendo utilizado um exemplar de *F. hepatica* de cada grupo para a análise histológica. Para a análise dos dados, foi utilizado a tabela de contingência para o teste do qui-quadrado. Após 15h de análise, observou-se que o OE de *C. citratus* e o citral inibiram a motilidade da *F. hepatica* em todas as concentrações testadas e o OE de *C. wynterianus* apenas nas concentrações de 0,05 e 0,1% ( $\text{m v}^{-1}$ ). Nos OEs e no citral houve a perda de espinhos e de uma das camadas do tegumento, com exceção do citral na concentração de 0,025% ( $\text{m v}^{-1}$ ) onde os espinhos e os tegumentos continuaram presentes.

Palavras-chaves: Fasciolose. Produtos naturais. Trematoda.



## ABSTRACT

TEMPORIM NOVAES, MARCELLE. **Chemical characterization and *in vitro* anthelmintic activity of citral and the essential oils *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon wynterianus* on adults of *Fasciola hepatica***. 2017. 50p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2017.

The parasite *Fasciola hepatica* is a trematode that affects the liver of cattle, sheep, wild animals and humans. It is responsible for large economic losses in several countries. Resistance in *F. hepatica*, mainly to triclabendazole, has stimulated the search for alternative products. The aim of this work was to evaluate the activity of the essential oil (EO) of *Cymbopogon citratus* (lemon grass), citral (neral + geranial) and *Cymbopogon wynterianus* (citronella) at 0.025 %, 0.05% and 0.1% ( $\text{m v}^{-1}$ ) on adult parasites of *F. hepatica*. EOs were extracted using a Clevenger type apparatus and citral was obtained commercially. The EOs and citral were characterized by gas chromatography (CG-DIC and CG-MS). Eight adults of *F. hepatica* were used for each group in individual Petri dishes and these were analyzed after three, twelve and fifteen hours. One sample of *F. hepatica* from each group was used for histological analysis. For the analysis of the data, the contingency table was used for the chi-square test. After 15 h of analysis, the EO of *C. citratus* and citral were found to inhibit the motility of *F. hepatica* at all concentrations tested and the EO of *C. wynterianus* inhibit the motility only at 0.05 and 0.1% ( $\text{m v}^{-1}$ ). It was observed that the treatments with EOs and citral promoted the loss of spines and one of the layers of the integument, except for the citral at 0.025% ( $\text{m v}^{-1}$ ).

Keyword: Fasciolosis. Fluke. Natural products.

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1 Fotomacrografia de <i>Fasciola hepatica</i> .....	12
Figura 2 Fórmula estrutural dos estereoisômeros geranial e neral.....	20
Figura 3 Estrutura da molécula citronelal.....	22
Figura 4 Exemplar de <i>Fasciola hepatica</i> com cortes transversais, demonstrando local de secção dos espécimes.....	27
Figura 5 Análise histológica de adultos de <i>Fasciola hepatica</i> no aumento de 40X mantidas <i>in vitro</i> por 15h com o controle (-) (A), controle positivo (B), óleo essencial de capim-limão nas concentrações de 0,025; 0,05 e 0,1 % (m v <sup>-1</sup> ). A figura A mostra o tegumento com espinhos íntegros (setas). A figura B mostra o tegumento com espinhos internalizados (setas). Nas figuras C, D e E mostra o tegumento com ausência de espinhos (setas).....	35
Figura 6 Análise histológica de adultos de <i>Fasciola hepatica</i> no aumento de 40X mantidas <i>in vitro</i> por 15h com o controle (-) (A), controle positivo (B), componente majoritário citral nas concentrações de 0,025; 0,05 e 0,1 % (m v <sup>-1</sup> ). A figura A mostra o tegumento com espinhos íntegros (setas). A figura B mostra o tegumento com espinhos internalizados (setas). A figura F mostra o tegumento com espinhos (setas), e a G e H mostra o tegumento com ausência de espinhos (setas).....	36

Figura 7 Análise histológica no aumento de 40X de adultos de *Fasciola hepatica* mantidas *in vitro* por 15h com o controle (-) (A), controle positivo (B), óleo essencial de citronela nas concentrações de 0,025; 0,05 e 0,1 % (m v<sup>-1</sup>). A figura A mostra o tegumento com espinhos íntegros (setas). A figura B mostra o tegumento com ausência de espinhos (setas). A figura I mostra o tegumento com espinhos (setas), e a J e K mostra o tegumento com ausência de espinhos (setas)..... 37

## LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
Tabela 1	Critérios de avaliação da motilidade da <i>Fasciola hepatica</i> adulta.....	25
Tabela 2	Constituintes químicos nos óleos essenciais de <i>Cymbopogon citratus</i> e <i>Cymbopogon wynterianus</i> e do Citral da marca Sigma Aldrich.....	28
Tabela 3	Comparação da caracterização química dos óleos essenciais <i>C. citratus</i> (citronela) e <i>C. wynterianus</i> (capim-limão) com outros estudos.....	29
Tabela 4	Análise do óleo essencial capim-limão e seu majoritário citral e do óleo essencial de citronela nas concentrações 0,025% ( $\text{m v}^{-1}$ ); 0,05% ( $\text{m v}^{-1}$ ) e 0,1% ( $\text{m v}^{-1}$ ) sobre a motilidade da <i>F. hepatica</i> .....	31
Tabela 5	Análise da motilidade (%) <i>F. hepatica</i> em cada hora analisada em relação a concentração.....	33
Tabela 6	Comparação da motilidade da <i>F. hepatica</i> após as 15 h com a análise histológica.....	34

## SUMÁRIO

	Página
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	11
2.1 Aspectos Gerais da Fasciolose e Seus Agentes.....	11
2.2 Epidemiologia da Fasciolose .....	13
2.3 Diagnóstico da <i>F. hepatica</i> .....	15
2.4 Controle da Fasciolose .....	17
2.5 Novas Perspectivas para o Controle da Fasciolose .....	18
2.6 Óleos Essenciais .....	19
2.6.1. <i>Cymbopogon citratus</i> .....	20
2.6.2. <i>Cymbopogon wynterianus</i> .....	22
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23
3.1 Obtenção dos Óleos Essenciais e do Citral .....	23
3.2 Caracterização Química dos Compostos Voláteis .....	24
3.3 Coleta das Amostras para o Modelo Experimental .....	24
3.3 Processamento e Análise das Amostras .....	25
3.3 Análise histológica.....	26
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	27
4.1 Caracterização Química dos Óleos Essenciais e do Citral.....	27
4.2 Atividade dos Óleos Essenciais e do Citral sobre a Motilidade da <i>F. hepatica</i> .....	30
4.3 Avaliação histológica.....	34
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	38
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	39

## 1. INTRODUÇÃO

A fasciolose é uma doença que acomete o fígado e é responsável por causar grandes perdas econômicas em bovinos e ovinos, estima-se que 250 milhões de ovinos e 350 milhões de bovinos estão em risco em todo o mundo (BEESLEY et al., 2017). De acordo com a Organização Mundial da Saúde a fasciolose é uma doença negligenciada entre a população humana na América do Sul, Europa Ocidental e Irã (WHO, 2007).

No Brasil, a distribuição acontece em todo o país, sendo tradicionalmente endêmico no sul e mais recentemente no sudeste. No Espírito Santo o primeiro caso da doença foi registrado em 2005 pelo Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo (IDAF), e a prevalência de fígados em bovinos condenados por fasciolose entre 2010 a 2014 variaram entre 8,27 e 10,33% de todos os estabelecimentos registrados no estado (GUEDES et al., 2016).

As perdas devido a condenação de fígados em matadouro-frigorífico, diminuição no peso de carcaças e produção leiteira, acarretam grandes prejuízos. No Espírito Santo nos anos de 2006 a 2009 as perdas relacionadas a presença da fasciolose gerou um prejuízo de US\$ 380 mil dólares (BERNARDO et al., 2011).

O controle da fasciolose é realizado basicamente com produtos químicos, sendo a principal substância existente no mercado o triclabendazole (TCBZ), fármaco do grupo dos benzimidazóis que apresenta uma eficácia de 98% em larvas e adultos e se tornou de forma rápida a droga de escolha para tratar infecções. A resistência em *F. hepatica* tem crescido muito nos últimos anos, principalmente ao triclabendazole, como relatado por Fairweather (2011), Bowman (2010) e Keeley et al. (2016).

Estudos com novas vacinas têm sido realizados, porém os resultados obtidos tornam a comercialização inviável em função do custo (HENKER et al., 2017). Uma outra opção é o uso de moluscicidas no hospedeiro intermediário da *F. hepatica*, mas esta alternativa é proibida por conta do desequilíbrio que pode trazer na natureza (WANG et al., 2006).

Assim, a descoberta de novas substâncias é necessária, principalmente quando este for um produto de origem natural, como os óleos essenciais, pois podem reduzir gastos para o produtor, reduzir possíveis contaminações no ambiente e auxiliar no controle sanitário (ARAÚJO et al., 2002). Diante disto, objetivou-se com este estudo avaliar a atividade sobre a motilidade da *F. hepatica in vitro* dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (capim-limão) e seu componente majoritário citral, e *Cymbopogon wynterianus* (citronela).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos Gerais da Fasciolose e Seus Agentes

Os hospedeiros definitivos da *F. hepatica* são animais silvestres, domésticos e ruminantes, sendo que a espécie humana também é considerada como hospedeiro definitivo (ZAIDEN et al., 2008).

O hospedeiro intermediário da *F. hepatica* são os moluscos do gênero *Lymnaea*, no Brasil três espécies foram identificadas: *Lymnaea columella*, *L. viatrix* e *L. cubensis* (PILE et al., 2001). O primeiro relato no Brasil sobre a ocorrência do molusco *L. columella* naturalmente infectado por estádios intermediários de *F. hepatica* de acordo com Silva et al., (1995), foi no município de Itajubá em Minas Gerais, este molusco está presente em água de pouca profundidade, preferindo ficar em margens de lagoas, pequenos açudes e canais de água limpa (D'ALMEIDA et al., 2014).

Assim, a ocorrência da *F. hepatica* está relacionada com a presença do hospedeiro intermediário que necessita de habitats adequados para a sua sobrevivência, além de temperatura e humidade favoráveis, e a presença do hospedeiro definitivo que elimina os ovos para o ambiente (MENDES, 2006).

O trematódeo *F. hepatica* pertence ao reino animal, ao filo Plathelminthes, a classe Trematoda, a sub-classe Digenea, família Fasciolidae, gênero *Fasciola* e a espécie *F. hepatica* (TORRES, 2011). É conhecido popularmente por baratinha do fígado (GOMES, 2014) é um parasito que pode infectar diferentes espécies de animais, como os animais silvestres e os domésticos, especialmente os ruminantes, e é responsável por causar a fasciolose que é uma zoonose (TRIVILIN et al., 2013).

Existem duas espécies de *Fasciola* spp., a *Fasciola gigantica* que é comum na Índia (SINGH et al., 2009) e a *F. hepatica* que ocorre no Brasil (QUEIROZ et al., 2002). A *F. hepatica* é hermafrodita, grande e achatado dorso-ventralmente, tem ceco e genitália ramificada, as ventosas são a sua estrutura de fixação (MARTINS et al., 2007). Quando jovem apresenta 1 a 2 mm de comprimento, tendo uma forma de lanceta. Quando alcança a forma



adulta apresenta um comprimento de 3,5 cm (Figura 1A), apresentando uma forma foliácea, com coloração marrom-acinzentada, e com duas ventosas (uma oral e uma ventral), e cone cefálico (FAIRWEATHER et al., 2012), a figura 1B mostra a estrutura da *F. hepatica*.

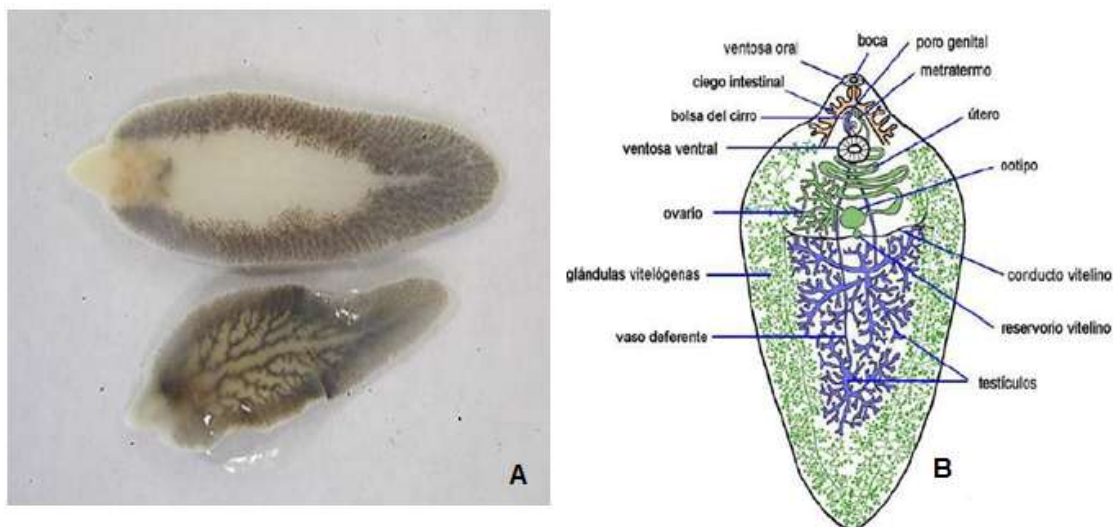


Figura 1: A - Fotomicrografia de *Fasciola hepatica*. B – Estrutura da *F. hepatica*. FONTE: Imagem A cedida por Isabella V. F. Martins; B – Disponível em: <<lacasamorett.com>>.

Quando adulto o parasito consegue depositar 3.000 ovos por dia que se movem em direção ao intestino via bile sendo eliminado nas fezes antes de se tornarem embrionados (ACHA; SZYFRES, 2003). Os ovos não embrionados são liberados no ambiente e o seu desenvolvimento ocorre na presença de ambientes úmidos com a formação de um miracídio (TESSELE et al., 2013). Este miracídio penetra até o hospedeiro intermediário (caramujo do gênero *Lymnaea*) dando origem a um esporocisto, cada esporocisto dá origem a 5-8 rédias que dão origem as rédias filhas e cercárias, dessa forma, as cercárias saem do caramujo em 4-7 semanas e se encistam nas lâminas de vegetais, logo abaixo do nível da água transformando-se em metacercárias prontas para infectar o hospedeiro definitivo (TESSELE et al., 2013).

A infecção no hospedeiro definitivo ocorre pela ingestão de metacercárias infectantes presentes na vegetação ou na água que atravessam a parede intestinal, movem-se em direção a cavidade peritoneal e penetram no parênquima hepático (GOLDEN et al., 2010). O parasito apresenta nessa fase 0,3 mm de comprimento, continua a passar através do fígado pelas próximas seis ou sete semanas e invade os ductos biliares, onde ocorre seu

amadurecimento e o aparecimento dos ovos no material fecal entre 56 e 90 dias após a infecção inicial (ACHA; SZYFRES, 2003).

Os sintomas provocados pela infecção por *F. hepatica* sofrem variação de um hospedeiro para o outro devido a carga parasitária, a fase que o parasito se encontra (aguda ou crônica), a localização e a época do ano. A fase aguda é causadora de alta mortalidade, quando o animal apresenta-se nesta fase da doença, os parasitos jovens são encontrados no parênquima hepático e os ovos não são detectados nas fezes, mas já existem lesões da infecção. O animal apresenta fraqueza, com mucosas pálidas, às vezes pode apresentar o fígado dilatado e palpável juntamente com dor abdominal e ascite (MENDES, 2006).

Por outro lado, quando o animal apresenta a fase crônica da doença, os parasitos são encontrados nos ductos biliares, o animal apresenta hiperplasia das paredes dos ductos biliares, calcificação das lesões tissulares, além de anemia, ascite, mucosas pálidas e edema submandibular (MENDES, 2006).

Devido a todos estes sinais e sintomas que o animal apresenta, ocorrem as grandes perdas econômicas relacionadas a diminuição da produção de leite, redução do ganho de peso, baixas taxas de crescimento e comprometimento da fertilidade, além da condenação de fígado infectados tendo um valor total estimado de 200 milhões de dólares por ano (QUEIROZ, et al., 2002.; GOLDEN, et al., 2010).

Nas Américas, Pile et al., (2000), registraram 3.286 casos em humanos, sendo a grande maioria achados acidentais que estavam distribuídos nos Estados Unidos, México, Cuba, Costa Rica, Porto Rico, Venezuela, Peru, Bolívia, Chile, Argentina, Uruguai e Brasil (com maiores números nas regiões Sul e Sudeste).

## **2.2 Epidemiologia da Fasciolose**

Este trematoda está presente na Bolívia, Peru, Equador, Irã, Egito e também no Brasil principalmente em Goiás, Mato Grosso do Sul, Bahia e Espírito Santo (ARAÚJO et al., 2007; JAROS et al., 2010; MARTINS et al., 2012).

No Reino Unido a prevalência da fasciolose em gados leiteiros adultos varia de 48% a 76% (SALIMI-BEJESTANI et al., 2005; MCCANN et al., 2010), enquanto na Europa Ocidental nos países como Bélgica, Alemanha e Espanha foram relatadas prevalências de 37%, 50% e 61%, respectivamente (MEZO et al., 2008; BENNEMA et al., 2009; KUERPICK et al., 2012). Esta prevalência ocorre devido a presença de verões mais úmidos e invernos mais quentes (HOWELL et al., 2015). Fatores existentes no Brasil como sua hidrografia, topografia e as áreas de pastagens alagadas contribuem para a manutenção do molusco e a disseminação da fasciolose durante todo o ano (SILVA et al., 2008).

Além disso, nos últimos anos a comercialização de animais entre os proprietários de gados tem cooperado para o aumento da distribuição da fasciolose em regiões que não apresentavam a doença. Nos municípios de Itajubá – MG 70% dos bovinos das fazendas visitadas estavam infectados, além disso, foram também encontrados a presença dos moluscos infectados com a fase larval da *F. hepatica* (LIMA et al., 2009).

Ferramentas, como o Sistema de Informação Geográfica (SIG), tem sido favorável em decisões estratégicas que visam diminuir o risco de ocorrência de fasciolose, além de fazer estimativas endêmicas da doença e ser útil em locais onde não existem dados disponíveis (MARTINS et al., 2012).

Em estudo realizado por Gomes (2014) no Rio Grande do Sul em relação a procedência de bovinos que foram abatidos, os municípios que tiveram uma maior prevalência de fasciolose no período de agosto 2012 à Julho 2013 foram Torres (100%), Capivara do Sul (86%), Sentinela do Sul (85%) e Três Forquilhas (81%). As cidades de Santa Catarina (Joinville, Blumenau, Florianópolis, Itajaí) e Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Canoas, Santa Maria, Pelotas) são áreas onde há uma maior incidência de fasciolose em gados, sendo também um potencial de risco para os humanos (ALEIXO et al., 2015).

Bennema et al., (2014) coletaram informações em 1032 municípios de fígados condenados por fasciolose pelo Serviço de Inspeção Federal (MAPA/SIF), e foi observado que a maior prevalência foi nos estados do Sul, com a presença de focos da fasciolose ao longo do litoral do Paraná e Santa Catarina e no Rio Grande do Sul.

Martins et al., (2012) verificaram que dos 23 municípios da região sul do Espírito Santo, a fasciolose foi diagnosticada em 18 (78%), sendo que a região de Jerônimo Monteiro foi a que teve uma maior prevalência da fasciolose (66,7%). Em um outro estudo feito nesta mesma região em ovinos, caprinos e bubalinos foi constatado que esta região possui um grande foco de dispersão da fasciolose (CARNEIRO et al., 2013).

No sul do Espírito Santo foi feito um levantamento sobre o número de animais acometidos por fasciolose em 2015, do total de 12.428 bovinos, 3.716 fígados (30%) foram condenados por fasciolose. Os municípios com maiores números de condenações foram Cachoeiro de Itapemirim (12,7%) e Castelo (6,5%) (NOVAES et al. 2016).

### **2.3 Diagnóstico da *F. hepatica***

O diagnóstico da fasciolose geralmente é realizado por meio da detecção dos ovos nas fezes ou pelo exame *post mortem* (presença do parasito no fígado e nos ductos biliares), mas exames coproparasitológicos só podem ser aplicados após o período pré-patência e alguns animais infectados podem não ser detectados pelo teste (SÁNCHEZ-ANDRADE et al., 2000).

Para evitar que animais infectados pela *F. hepatica* não sejam detectados pelos testes coproparasitológicos, testes de ELISA para detecção de anticorpos tanto em soro quanto no leite foram criados com o objetivo de ter um diagnóstico precoce, mas devido ao fato de no Brasil não ter kits de ELISA comerciais disponíveis, seu uso fica limitado devido ao custo (BERNARDO et al., 2013).

Bernardo et al., (2012) comparando o kit comercial de ELISA para detecção de coproantígenos e um exame coproparasitológico de sedimentação, concluíram que o kit ELISA foi o mais sensível que o coproparasitológico, ainda que este não possa ser descartado devido sua eficiência.

Girão e Ueno (1985) desenvolveram a técnica da tamisação onde são utilizados quatro tamises para a contagem dos ovos de *F. hepatica* nas fezes de ruminantes, os três primeiros tamises permitem a passagem dos ovos

enquanto o último retém os ovos e as fibras fecais finas facilitando a visualização dos ovos, esta técnica requer para cada amostra um tempo de 10 a 15 minutos e não requer uso de solução química e vidraria.

A técnica de Dennis et al., (1954) requer uso de uma solução detergente, é utilizada em estudos epidemiológicos que envolvam a *F. hepatica* e na comprovação da eficácia de anti-helmínticos. Comparando a técnica de quatro tamises com a de Dennis et al., (1954), Girão e Ueno (1985) concluíram que não houve diferenças significativas entre elas em relação ao número de amostras positivas de *F. hepatica*, porém a técnica de quatro tamises foi mais prática e rápida de executar.

Martins et al., (2008) testando a sensibilidade e a reprodutibilidade da técnica de sedimentação proposta por Foreyt (2005) no diagnóstico de *F. hepatica*, observaram que dos 97 bovinos abatidos no abatedouro de Atílio Vivacqua, sul do Espírito Santo, que estavam positivos ao exame macroscópico (presença do parasito no fígado e nos ductos biliares no exame *post mortem*), 58 apresentaram positivos para o exame de sedimentação fecal (FOREYT, 2005) tendo uma sensibilidade de 59,8% e especificidade de 100%.

Martins et al., (2008) neste mesmo estudo analisaram 63 amostras utilizando à técnica de 4 tamises, e dessas amostras, 27 foram positivas, apesar desta técnica ser utilizada em muitos estudos que envolvam a *F. hepatica*, a técnica de Foreyt (2005) foi a que demonstrou uma maior sensibilidade.

Uma outra forma de diagnóstico de fasciolose é por meio da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). Perez et al., (2013) realizaram esta técnica para diagnosticar a infecção por *F. hepatica* em ovelhas, e concluíram que a PCR é mais sensível para diagnosticar a infecção e também para detectar a resistência a medicamentos em animais infectados, quando comparado com técnicas de contagem de ovos fecais e teste de redução de copro-antígenos.

## 2.4 Controle da Fasciolose

São recomendadas medidas estratégicas preventivas associadas aos tratamentos dos indivíduos infectados em programas de controle. O ideal é associar o controle dos hospedeiros intermediários a melhorias das condições ambientais e o uso de antiparasitários nos animais com fasciolose (AVELAR et al., 2013).

Os usos de métodos, químicos, físicos e biológicos são os mais utilizados para eliminar o hospedeiro intermediário, mas é importante ressaltar que estes produtos sejam de baixo custo, atóxico e que não deixem resíduos (CUNHA; MARQUES; MATTOS, 2007).

O uso de produtos químicos como moluscidas para o controle dos moluscos em países como o Reino Unido não são permitidos devido aos danos que podem trazer para o ambiente. O uso de drenagem é uma opção ideal, porém é considerada uma alternativa cara (HOWELL, et al., 2015).

Utilizar o controle biológico em hospedeiros intermediários por meio de predadores sobre limneídeos, como patos, gansos, moluscos terrestre ou aquáticos são citados por Ximenes et al., (1995) como uma forma de controle da fasciolose.

Existem alternativas que podem ser utilizadas para o controle da *F. hepatica*, como a drenagem de pasto para reduzir a taxa de eclosão dos ovos, a sobrevivência das fases de vida livre do parasito e a população dos moluscos; estratégias de gestão de pastagem para evitar o contato das metacercárias e hospedeiros definitivos susceptíveis; e o uso de drogas anti-helmínticas (SARGINSON; SCOTT, 2011).

O triclabendazole (TCBZ) é um fármaco de escolha para o controle de animais infectados por *F. hepatica* desde 1983, mas infelizmente casos de resistência foram relatados por diversos autores (FAIRWEATHER, 2011; BOWMAN, 2010) mostrando que é necessário que sejam elaborados estudos para descobertas de novos compostos (MASSOUD, et al., 2012).

Atualmente, estudos como o de Golden et al. (2010), estão em andamento para a criação de vacinas que estejam disponíveis para os produtores controlarem a infecção causada por este trematoda, mas o desenvolvimento de uma vacina requer anos de estudos.

Diante disso, existe a necessidade de descobrir novos compostos, como extratos de plantas e óleos essenciais para o controle da fasciolose. As chances de serem encontrados compostos com atividade em *F. hepatica* são grandes principalmente em produtos do metabolismo secundário (alcalóides, saponinas, taninos, flavonóides e terpenos) de plantas (Mercado et al., 2015).

## 2.5 Novas Perspectivas para o Controle da Fasciolose

Produtos naturais como as plantas medicinais tem se tornado uma nova alternativa para diversas terapêuticas (SANTOS et al., 2015). Nos últimos dez anos o número de testes utilizando extratos de plantas em diferentes linhas de pesquisa aumentou devido a toxicidade e casos de resistência que os medicamentos podem trazer (ABDEL-GHAFFAR et al. 2011; SINGH et al., 2009). Assim, testes *in vitro* para avaliarem a atividade de extratos de plantas contra o parasito adulto e ovos de *F. hepatica* vêm sendo desenvolvidos.

Em um estudo feito por Pereira et al. (2016) onde foi avaliado a atividade anti-helmíntica de *Momordica charantia* (melão de são caetano) contra ovos de *F. hepatica*, foram utilizados o extrato bruto liofilizado das folhas do melão de são caetano e suas sub-frações, obtidos a partir de partição líquido-líquido com solventes orgânicos. No teste os ovos foram incubados em concentrações acima de 12,5 mg/mL afetando assim o desenvolvimento embrionário e apresentando a inibição da formação miracídios mostrando uma eficácia de até 90%.

Moazeni et al., (2016) utilizaram o extrato metanólico de sementes de *Peganum harmala* (harmal) nas concentrações de 1 e 3 mg/mL em ovos de *F. hepatica* e observaram a sua atividade letal sobre os ovos.

Um outro extrato metanólico que também foi testado *in vitro* foi o *Zingiber officinale* (gengibre) que na concentração de 1 mg/mL com 24, 48 e 72 h de tratamento apresentou efeito de 46,08; 51,53 e 69,09%, respectivamente. Na concentração de 5 mg/mL apresentou atividade de 98,84% depois de 24h, e na concentração de 5 mg/mL e 10 mg/mL com 48 e 24 h de tratamento apresentou atividade letal sobre os ovos de 100% (MOAZENI; KHADEMOLHOSEINI, 2016). Marques (2017) utilizando extratos de plantas

sobre ovos de *F. hepatica*, observaram que os extratos *Harpagophytum procumbens* (garra-do-diabo) 0,25%, *Psidium guajava* L. (goiabeira) 0,25 e 0,5%, *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) 0,1; 0,25 e 0,5% e *Eugenia uniflora* L. (pitanga) 0,1% não permitiram a eclosão dos miracídios.

Guedes (2017) em um estudo utilizando os extratos a 0,5% das cascas do *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão), das folhas de *Psidium guajava* L. (goiaba), das folhas do *Guapira graciliflora* (joão mole), das folhas da *Guapira noxia* (guapira do cerrado), das folhas do *Momordica charantia* (melão de são caetano) e das raízes da *Harpagophytum procumbens* (garra do diabo) sobre a *F. hepatica* adulta, depois de 12 h apresentaram atividade fasciolicida.

Singh et al. (2009) utilizando os óleos essenciais *Alho sativum* (alho) e *Piper longum* (pimenta indiana), observaram que o alho na concentração de 1 e 3 mg/mL reduziu a atividade muscular da *F. gigantica* enquanto a pimenta indiana causou paralisia flácida na concentração de 3 mg/mL.

Jeyathilakan et al. (2010) avaliaram a atividade dos óleos essenciais de *Cymbopogon nardus* (citronela) e *Azadirachta indica* (neem) em *F. gigantica* adulta na concentração de 1%, e o estudo demonstrou que a citronela apresentou atividade anti-helmíntica.

## 2.6 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais são voláteis e são adquiridos de partes de plantas por meio de processos físicos, como destilação por arraste a vapor de água, destilação a pressão ou outro método adequado (BRASIL, 2007).

Os óleos essenciais são misturas complexas de diversas classes, tais como, éteres, fenóis, cetonas, aldeídos, ésteres, óxidos, lactonas, ácidos orgânicos, furanos, cumarinas, peróxidos e enxofres. Estes óleos apresentam diferentes concentrações, geralmente é encontrado um componente de maior concentração que é chamado de majoritário, e os de menores concentrações chamados de traços (SIMÕES; SPITZER, 2003).

Dependendo da família que as plantas pertencem estas armazenam os óleos essenciais em órgãos anatômicos específicos e quando este órgão representa um substrato renovável, como uma folha, flor, fruto ou semente é



possível extrair o óleo sem extinguir a planta, mas quando é necessário utilizar toda planta para a extração do óleo, existe uma alternativa que é o cultivo racionalizado e estabilizado que garante a reprodutibilidade do perfil químico do produto (SIANI et al., 2000).

Os óleos essenciais apresentam, entre outras, propriedades antibacteriana (FRANZIOS et al., 1997), antioxidante (BAKKALI et al., 2008), antiviral (NERIO et al., 2010), anti-inflamatória (LARA JUNIOR et al., 2012) e anti-helmíntica (OLIVEIRA et al., 2013). Em função destas propriedades, os óleos essenciais têm sido utilizados na elaboração de cosméticos, medicamentos (diurético, sedativo e expectorante), produtos de limpeza e inseticidas (FORNARI et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2014).

### 2.6.1. *Cymbopogon citratus*

*Cymbopogon citratus*, também conhecida como erva-cidreira ou capim-limão, pertence ao gênero *Cymbopogon*. Trata-se de uma planta perene que pode atingir 2 metros de altura, possui folhas ásperas e cortantes com 60 a 100 cm de comprimento e 0,5 a 1,5 cm de largura. É muito utilizada em cosméticos devido seu odor de limão e possui em sua constituição química, entre outros compostos, o citral que ocorre como uma mistura de dois aldeídos estereoisômeros (geranial e neral) (Figura 2) (OWAMAH; ALFA; DAHUNSI, 2014).

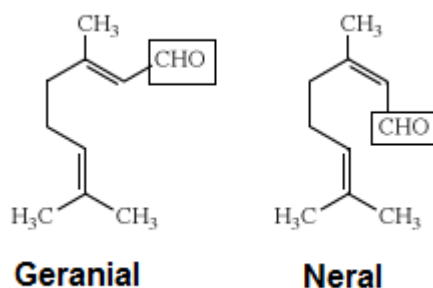


Figura 2 – Fórmula estrutural dos estereoisômeros geranial e neral.

Em um estudo feito Koremblum et al., (2013), os autores relataram que o citral, componente majoritário do óleo essencial capim-limão, foi o responsável por causar a morte de uma bactéria redutora de sulfato em meio líquido com a concentração mínima inibitória de 0,17 mg mL<sup>-1</sup>, constatando seu potencial biocida.

Boukhatem et al., (2014) analisaram a atividade *in vivo* do óleo essencial do capim-limão 10 mg mL<sup>-1</sup> como anti-inflamatório tópico e oral e *in vitro* como antifúngico, utilizando a fase líquida e de vapor, os resultados mostraram que este óleo poderá ser utilizado como um medicamento que pode vir a ser desenvolvido no futuro.

Gbenou et al., (2013) observaram que este mesmo óleo também apresentou atividade anti-inflamatória em ratos Wistar, apresentando um efeito preventivo em 3.000 mg kg<sup>-1</sup> de peso animal.

Tzortzakis e Economakis (2007) avaliaram a atividade antifúngica (*Colletotrichum coccodes*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum*, *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus niger*) do óleo essencial *C. citratus* dissolvido em 5% de Tween 20, e observaram que na concentração de 0,25% (mg mL<sup>-1</sup>) houve a inibição de 70% dos esporos, e a 0,05% (mg mL<sup>-1</sup>) 500 ppm a esporulação fúngica foi inibida por completo.

Kurita et al., (1981) observaram que o citral tem a capacidade de atuar como agente fungicida devido a capacidade que ele tem de formar um complexo de transferência de carga como um doador de elétrons de células fúngicas, resultando na morte do fungo.

Ahmad e Vilojean (2015) avaliaram a atividade antimicrobiana *in vitro* deste mesmo óleo com íons prata diluídos para darem a concentração final de 8.000 ppm usando DMSO 1% e água destilada estéril como diluentes, e observaram que quando estes utilizados em conjunto ofereceram uma nova chance de produzir novas combinações contra microrganismos infecciosos.

### 2.6.2. *Cymbopogon wynterianus*

*Cymbopogon wynterianus*, popularmente conhecida por citronela, foi introduzida no Brasil em 1946 encontrando boas condições para o seu desenvolvimento. Pertence à família Poaceae, subfamília Panicoideae e tem como principal característica a de repelir insetos, 80% do seu óleo é composto por monoterpenos e uma pequena parte por sesquiterpenos. Os principais terpenóides encontrados no seu óleo são citronelal, citronelol e geraniol, sendo que o citronelal (Figura 3) é o responsável pelo seu aroma característico de limão (BENETI et al., 2011; VELOSO et al., 2015).

Geralmente o componente do óleo essencial pertence a uma classe de substâncias químicas conhecida por terpeno, quando apresentam oxigênio (O) em sua estrutura. Esse termo terpenóides é utilizado para designar as substâncias de origem biossintética que deriva de unidades de isopreno de fórmula química  $(C_5H_8)_n$  (CAREY, 2011; SOLOMONS, 2013).

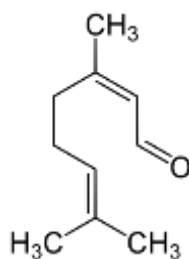


Figura 3 – Fórmula estrutural citronelal.

Em estudos realizados por Rodrigues et al., (2013) utilizando o óleo essencial de citronela, foi observada a atividade moderada contra as larvas de *Artemia salina* (espécie de crustáceo) e também atividade moluscicida.

Outros autores também relataram atividade cardiovascular (MENEZES, et al., 2010), anti-inflamatória (LEITE et al., 2010) e analgésica (GUIMARÃES et al., 2013) ao utilizar este óleo.

O óleo essencial de *C. wynterianus* mostrou-se que ao ser utilizado na concentração de 12,5% ( $mg\ mL^{-1}$ ) e 25% ( $mg\ mL^{-1}$ ) causou a mortalidade de 100% das larvas e teleógenas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (SANTOS et al., 2015). Uma outra atividade deste óleo essencial foi

observada por Oliveira et al., (2011) contra a levedura *Candida albicans* em que nas concentrações de 625  $\mu\text{g mL}^{-1}$  inibiu o crescimento de todas as cepas que foram testadas e 1250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  mostrou atividade fungicida.

Pereira et al. (2011) testando o óleo essencial de *C. wynterianus* Jowitt nas concentrações 156; 312; 625 e 2500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  no fungo *Trichophyton mentagrophytes* que causa dermatofitose, foram observados que este óleo em todas concentrações testadas afetou a viabilidade fúngica, a germinação dos esporos além de inibir o desenvolvimento micelial, mostrando que este óleo pode ser usado como um produto antifúngico.

No estudo feito por Marques et al., (2013) utilizando o óleo essencial de *C. wynterianus* nas concentrações de 5, 10, 15 e 20% ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) sobre *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) foi visto que a mortalidade após 24 h de aplicação variou de 45 a 74% em função das doses crescentes dos óleos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção dos Óleos Essenciais e do Citral

As exsiccatas das plantas *Cymbopogon citratus* (n. 21.629) e *Cymbopogon wynterianus* (n 21.537) encontram-se depositadas no herbário da Universidade Federal do Espírito Santo- (VIES) - Subcuradoria Campus de Alegre. As partes aéreas destas plantas foram coletadas a partir do primeiro corte de plantas jovens com, aproximadamente, 1 m de altura. A coleta foi realizada no período matutino em casa de vegetação localizada no município de Alegre – ES (20° 44' 49" de latitude S, 41° 27' 58" de longitude W e altitude de 127 m).

Os óleos essenciais de *C. citratus* (capim limão) e *C. wynterianus* (citronela) foram obtidos a partir de 300g do material vegetal fresco. As folhas foram transferidas para um balão de destilação com 2 L de água que foi acoplado a um aparelho do tipo Clevenger. A destilação por arraste de vapor continuou por 3 h após a ebulição da água (PINHEIRO et al., 2013). Os óleos

essenciais foram acondicionados em frascos âmbar e mantidos no congelador até serem utilizados. O citral foi obtido comercialmente da empresa Sigma<sup>®</sup> Aldrich.

### **3.2 Caracterização Química dos Compostos Voláteis**

Os componentes voláteis dos óleos essenciais e do citral foram analisados utilizando um cromatógrafo gasoso com detector de massa acoplado (CG-MS) modelo QP-PLUS-2010 SHIMADZU. A coluna cromatográfica utilizada foi do tipo capilar de sílica fundida com a fase estacionária Rtx-5MS, com 30 m de comprimento e 0,025 mm de diâmetro interno, utilizando hélio como gás de arraste. A temperatura do injetor foi de 220 °C e do detector 300 °C. A temperatura da coluna foi inicialmente 60 °C, sendo programado para ter um aumento de 3 °C por minuto, até alcançar a temperatura máxima de 240 °C de acordo com a metodologia de Pinheiro et al., (2013).

Para a identificação dos compostos foi realizada comparações dos espectros de massas com os existentes na biblioteca NIST/EPA/NIH08 Mass Spectral Library, com a literatura e pelo índice de Kovat's (ADAMS, 2007).

A quantificação dos constituintes químicos dos óleos essenciais e do citral foi realizada em cromatografia de fase gasosa em equipamento SHIMADZU GC-2010 Plus, com detector de ionização de chama (CG-DIC). Foi utilizado o gás de arraste nitrogênio e coluna capilar Rtx-5MS, 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno. A temperatura do injetor foi de 240 °C e do detector 250 °C, sendo a programação da temperatura semelhante a utilizada no CG-MS. Uma quantidade de 10 mg da amostra foi diluída em diclorometano (1 mL), sendo injetado 1 µL da mistura (PINHEIRO et al., 2013).

### **3.3 Coleta das Amostras para o Modelo Experimental**

As amostras dos parasitos adultos de *F. hepatica* foram obtidas de fígados de bovinos recém-abatidos em matadouro-frigorífico localizado em Cachoeiro de Itapemirim, Espírito Santo. As amostras foram encaminhadas para o laboratório de Farmacognosia e Fitoquímica situado no Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética do uso de animais (CEUA-UFES) em julho de 2016 com o número de protocolo 13/2016.

### 3.3 Processamento e Análise das Amostras

Após as amostras serem encaminhadas ao laboratório, os parasitos foram analisados e selecionados os exemplares íntegros. Após a seleção estes foram lavados com água e colocados no meio Roswell Parck Memorial Institute (RPMI) Medium 1640 da Gibco® by life technologies™ conforme Fairweather (2005).

Foram utilizados os óleos essenciais *Cymbopogon citratus* (capim-limão) e seu componente majoritário citral, e *Cymbopogon wynterianus* (citronela), todos a 0,025% ( $\text{m v}^{-1}$ ), 0,05% ( $\text{m v}^{-1}$ ) e 0,1% ( $\text{m v}^{-1}$ ). Como controle positivo foi utilizado o sulfóxido de albendazol a 0,5% ( $\text{v.v}^{-1}$ ) da marca Agebendazol® 15% ( $\text{v.v}^{-1}$ ) Suspensão Injetável Agener União, e como controle negativo a associação dos solventes DMSO 0,25% ( $\text{m v}^{-1}$ ) e Tween® 80 0,25% ( $\text{m v}^{-1}$ ).

Os parasitos foram colocados individualmente em placa de Petri onde foram adicionados 10 mL da solução a ser testada, este volume foi o suficiente para cobrir por completo cada amostra. Foram realizados 8 repetições por grupo (óleo a ser testado ou componente majoritário, controle positivo e controle negativo) que foram analisadas a cada 3, 12 e 15 horas seguindo os critérios estabelecidos por Jeyathilakan et al., (2010). e por Kiuchi et al. (1987).

TABELA 1 - Critérios de avaliação da motilidade da *Fasciola hepatica* adulta.

Critério	Pontos avaliados (n)
M0	Sem motilidade
M1	Uma parte do corpo com movimento
M2	Duas partes do corpo com movimento
M3	Todas as partes do corpo com movimento

Os exemplares após cada hora analisada recebiam estímulo utilizando uma espátula de metal com o objetivo de serem observados a motilidade. Os exemplares eram mantidos a uma temperatura de aproximadamente 28°C.

Os dados foram submetidos a avaliação do índice de motilidade (fórmula 1), e motilidade relativa (fórmula 2) onde a resposta foi dada em porcentagem permitindo avaliar a motilidade relativa de cada óleo (KIUCHI et al., 1987), além disso os dados foram analisados utilizando a tabela de contingência para o teste do qui-quadrado no programa R na versão 3. 4. 0 (2017).

$$\text{Índice de Motilidade (IM)} = \frac{\sum nN_n}{\sum N_n} \text{ (Equação 1)}$$

Em que:

$\sum nN_n$  : Número de elementos da amostra analisada;

$\sum N_n$  : Quantidade de exemplares que apresentaram o ponto avaliado.

$$\text{Motilidade Relativa (MR)} = \frac{IM_{amostra}}{IM_{controle}} \times 100 \text{ (Equação 2)}$$

### 3.3 Análise histológica

Após a última hora de análise (15 horas), metade dos exemplares analisados foram individualmente transferidos para microtubos (2 mL) e fixados com formol a 10% (v.v<sup>-1</sup>). E a outra metade para microtubos com Bouin<sup>®</sup> Sigma Aldrich (USA) onde ficaram em contato durante 24 horas com esta solução fixadora e depois foram transferidos para o formalina a 10% (v.v<sup>-1</sup>), para serem submetidos a análise histológica.

As amostras foram encaminhadas para o laboratório de Patologia Animal do Hospital Veterinário da UFES onde foram submetidas a um corte transversal conforme a Figura 4.

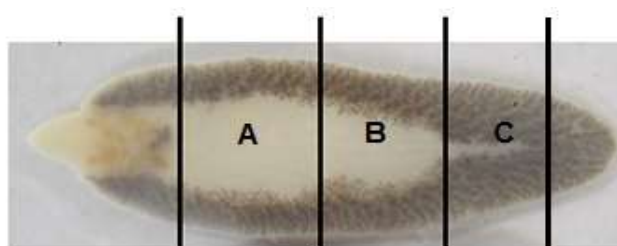


Figura 4 – Exemplar de *Fasciola hepatica* com cortes transversais, demonstrando as partes que foram seccionadas no espécime. FONTE: Imagem cedida por Isabella V. F. Martins.

Após as partes serem seccionadas, estas foram processadas da seguinte forma: álcool 70 °GL por 15 minutos, álcool absoluto por 1 h, novamente no álcool absoluto por 1 h e no xilol por 15 minutos, parafina e xilol a 60 °C por 15 minutos e inclusão em parafina.

Posteriormente, foram realizados cortes de 3 µm em um micrótomo e submetidos a coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) conforme Luna, 1968. As lâminas foram montadas com bálsamo, e foram observadas e fotografadas em microscópio óptico da marca Honyu modelo N-204 na objetiva de 100x para observar possíveis alterações morfológicas, tais como, presença de espinhos e perda de uma das camadas do tegumento.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização Química dos Óleos Essenciais e do Citral

A caracterização química dos compostos voláteis presentes nos óleos essenciais de *C. citratus* (capim limão), *C. wynterianus* (citronela) e do citral se encontram na tabela 2..



TABELA 2 – Constituintes químicos presentes nos óleos essenciais de *C. citratus*, *C. wynterianus* e no citral.

Compostos	Área (%)				
	CL	Citro.	Citral	IK cal	IK tab
Mirceno	12,53	0	0	990	991
(Z)-Ocimeno	0,32	0	0	1039	1040
Linalol	0,69	0,56	0	1097	1098
NI	0,24	-	-	1145	0
NI	1,02	-	-	1164	0
Neo-verbenol	1,42	0	0	1181	1182
Citronelol	0,28	13,69	0	1230	1228
Neral	<b>32,65</b>	0,77	38,65	1239	1240
Geraniol	2,38	18,57	0	1257	1255
Geranial	<b>47,44</b>	1,1	61,35	1269	1270
Undecan-2-ona	0,46	0	0	1291	1290
NI	0,32	-	-	1491	0
NI	0,24	-	-	2733	0
Limoneno	0	1,87	0	1026	1031
Isopulegol	0	0,58	0	1143	1146
Citronelal	0	<b>29,12</b>	0	1156	1153
Neral	0	0,77	<b>38,65</b>	1239	1240
Geraniol	0	<b>18,57</b>	0	1257	1255
Geranial	0	1,1	<b>61,35</b>	1269	1270
Acetato de citronela	0	3,09	0	1352	1354
Eugenol	0	0,38	0	1355	1356
Acetato de geranila	0	4,14	0	1382	1383
$\beta$ -elemeno	0	0,58	0	1387	1391
D-germacreno	0	1,46	0	1476	1480
Valenceno	0	0,1	0	1489	1491
A-muuroleno	0	0,23	0	1495	1499
Germacreno-A	0	0,8	0	1498	1503
$\gamma$ -cadineno	0	0,16	0	1508	1513
$\delta$ -cadineno	0	1,37	0	1519	1524
Elemol	0	4,71	0	1546	1549
Germacren-4-ol	0	4,31	0	1570	1574
10-epi- $\gamma$ -eudesmol	0	0,97	0	1626	1619
$\delta$ -cadinol	0	2,65	0	1638	1645
Hinesol	0	0,62	0	1642	1638
$\beta$ -Eudesmol	0	0,61	0	1645	1649
$\alpha$ -Cadinol	0	4,63	0	1652	1653
Bunesol	0	2,35	0	1665	1666
(E, E)-Farnesol	0	0,41	0	1717	1722
(E, Z)-Farnesol	0	0,11	0	1738	1742

Legenda: CL (Capim limão); Citro (Citronela); IK (Índice de Kovats); Cal (Calculado); Tab (Tabelado); NI (Não Identificado).

A Tabela 3 compara os componentes majoritários encontrados neste estudo com o de outros autores.

TABELA 3 – Comparação da caracterização química dos óleos essenciais *C. citratus* (citronela) e *C. wynterianus* (capim-limão) com outros estudos.

	Óleo essencial <i>C. citratus</i>		Óleo essencial <i>C. wynterianus</i>	
	Citronelal	Geraniol	Geranial	Neral
Neste estudo	29,12%	18,57%	47,44%	32,65%
Lorenzo et al., (2000)	36,1%	19,9%	-	-
Simic et al., (2008)	27%	22,78%	-	-
Deletra et al., (2015)	34,7%	22,5%	-	-
Guimarães et al., (2008)	-	-	37,42%	31,89%
Sonker et al., (2014)	-	-	52,9%	39,38%

Analizando o óleo essencial de capim-limão foram identificados nove compostos, sendo os majoritários o geranial (47,44%) e o neral (32,65%). A quantidade presente de citral no óleo essencial de capim limão corrobora com o valor encontrado por Paranagama (1991) no Sri Lankan com um teor maior que 70%, e também com Guimarães et al. (2008) que encontraram 31,89% de neral e 37,42% de geranial no *C. citratus* do município de Ijaci-MG. Enquanto Sonker et al. (2014) encontraram uma quantidade maior de geranial (52,9%) e neral (39,38%) neste mesmo óleo, porém do norte-leste de Uttar Pradesh. Estes estudos mostram que o componente majoritário do capim-limão é o citral. Na caracterização química do citral, ele apresentou 61,35% de geranial e 38,65% de neral.

Na análise do óleo essencial citronela os componentes majoritários foram citronelal (29,12%) e geraniol (18,57%), no estudo realizado por Lorenzo et al., (2000) neste mesmo óleo, porém oriundo do Rio Grande do Sul foram encontrados 36,1% de citronelal e 19,9% de geraniol.

Enquanto Simic et al. (2008) observaram que os compostos majoritários do óleo de capim citronela, obtido em Belgrado, foram citronelal (27%) e *trans*-geraniol (22,78%), e Deletre et al. (2015) observaram que os majoritários do óleo essencial desta planta obtida em Nactis (França) foram também citronelal (34,7%) e o geraniol (22,5%). Vale salientar que a variação tanto na composição química quanto nos teores dos compostos presentes nos óleos essenciais de plantas da mesma espécie pode ocorrer em função da diversidade genética, idade, luminosidade, temperatura, época e também horário da coleta (ORTIZ; MARRERO; NAVARRO, 2002; MORAIS, 2009).

#### **4.2 Atividade dos Óleos Essenciais e do Citral sobre a Motilidade da *F. hepatica***

Nessa etapa do trabalho foi avaliada a atividade de cada óleo essencial, e do componente majoritário citral sobre a motilidade de *F. hepatica*. A tabela 4 mostra que a partir de 12 h, o capim-limão e o citral a 0,025 % (m v<sup>-1</sup>), tiveram os 8 exemplares sem motilidade, enquanto a citronela permaneceu com apenas 4 exemplares sem motilidade. Este mesmo resultado continuou após 15h de análise nesta mesma concentração, o que mostra uma melhor ação do capim-limão e do citral quando comparado com a citronela.

TABELA 4 – Análise do óleo essencial capim-limão e seu majoritário citral e do óleo essencial citronela nas concentrações de 0,025% (m v<sup>-1</sup>); 0,05% (m v<sup>-1</sup>) e 0,1% (m v<sup>-1</sup>) sobre a motilidade da *F. hepatica*.

Tempo	Critérios	Capim-limão			Citral			Citronela			Controle (-)
		0,025 <sup>a</sup>	0,05 <sup>a</sup>	0,1 <sup>a</sup>	0,025 <sup>a</sup>	0,05 <sup>a</sup>	0,1 <sup>a</sup>	0,025 <sup>a</sup>	0,05 <sup>a</sup>	0,1 <sup>a</sup>	
3 h	M0	0*	7*	8*	0*	7*	8*	1*	1*	3*	0*
	M1	1*	1*	0*	0*	1*	0*	1*	1*	4*	1*
	M2	7*	0*	0*	8*	0*	0*	2*	0*	0*	2*
	M3	0*	0*	0*	0*	0*	0*	4*	6*	1*	5*
12 h	M0	8*	8*	8*	8*	8*	8*	4*	6*	8*	0*
	M1	0*	0*	0*	0*	0*	0*	4*	3*	0*	2*
	M2	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	4*
	M3	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	2*
15 h	M0	8*	8*	8*	8*	8*	8*	4*	8*	8*	0*
	M1	0*	0*	0*	0*	0*	0*	4*	0*	0*	3*
	M2	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	4*
	M3	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	1*

<sup>a</sup> = concentração em % (m v<sup>-1</sup>). \*Quantidade de exemplares enquadrada no critério analisado.

A tabela 4, demonstra que a partir das 3 horas na concentração de 0,05% ( $\text{m v}^{-1}$ ), 7 exemplares ficaram sem motilidade para o capim-limão e o citral, enquanto na citronela apenas 1 exemplar permaneceu sem motilidade e apenas uma parte do corpo com movimento e 6 exemplares ficaram com toda a parte do corpo com movimento. A partir de 12 horas todas as amostras ficaram sem motilidade no capim-limão e citral, e na citronela 5. A partir de 15 horas todos ficaram sem motilidade, com exceção do grupo controle. Novamente o capim-limão juntamente com o citral tiveram sua ação sobre a *F. hepatica* após as 3 h quando comparado com a citronela.

Os dados apresentados na Tabela 4 na concentração de 0,1% ( $\text{m v}^{-1}$ ) na primeira hora todos os exemplares ficaram sem motilidade no capim-limão e citral, enquanto na citronela 3 apresentaram sem motilidade, a partir das 12 e 15 horas todos os exemplares ficaram sem motilidade nos óleos e no citral, sendo que no controle nenhum ficou sem motilidade.

Na análise estatística foi observado que o valor de P foi menor que 5% mostrando que houve diferença estatística nas 3, 12 e 15 horas entre o capim-limão e seu majoritário citral, citronela e o controle negativo, além disso o Coeficiente de Contingência Ajustado (CCA) mostrou-se acima de 0,7 o que mostra uma alta associação dos dados analisados de acordo com Barbetta (2001).

A Tabela 5 apresenta o percentual da motilidade relativa que os exemplares mostraram a cada hora na concentração testada com base nas equações 1 e 2 citadas na metodologia, conforme proposta por Kiuchi et al., (1987). Analisando esta tabela, observa-se que na concentração de 0,025% ( $\text{m v}^{-1}$ ) após as 12 h não houve motilidade dos exemplares no óleo essencial capim-limão, o mesmo se repetiu para as concentrações de 0,05% ( $\text{m v}^{-1}$ ) e 0,1% ( $\text{m v}^{-1}$ ), este mesmo resultado se repetiu com o citral.

Para a análise do óleo essencial de citronela a ausência da motilidade foi observada apenas nas concentrações de 0,05 e 0,1% ( $\text{m v}^{-1}$ ) nas 15 h de análise. Um fato importante a ser considerado, é que na citronela a 0,025% ( $\text{m v}^{-1}$ ) após as 12 h, 25% das amostras apresentaram motilidade e após as 15 h a motilidade aumentou, acredita-se que a *F. hepatica* poupe sua motilidade em determinado tempo, talvez para garantir a sua sobrevivência por um tempo maior.

TABELA 5 - Análise da motilidade (%) da *F. hepatica* em cada hora analisada em relação a concentração.

Óleo essencial	Tempo (h)	Concentração		
		0,025% (m v <sup>-1</sup> )	0,05%(m v <sup>-1</sup> )	0,1%(m v <sup>-1</sup> )
Capim-limão	3	75%	4,80%	0%
	12	0%	0%	0%
	15	0%	0%	0%
Citral	3	80%	5%	0%
	12	0%	0%	0%
	15	0%	0%	0%
Citronela	3	85%	95%	35%
	12	25%	18,75%	0%
	15	28,50%	0%	0%

Pela análise da motilidade observa-se que o óleo que mais se destacou foi o capim-limão juntamente com o seu majoritário citral, observa-se que os valores da motilidade destes ficaram próximos, o que confirma que a ação do capim-limão sobre a motilidade da *F. hepatica* foi devido a presença do citral.

Estudos disponíveis na literatura sobre a utilização de testes com o óleo essencial *C. citratus* (capim-limão) ainda são escassos, porém, no estudo feito por Sunita et al. (2014) avaliando a variação sazonal da toxicidade do citral (Sigma) sobre esporocisto, rédia e a larva cercária de *F. gigantica*, foi visto que fatores como, alta temperatura, pH, dióxido de carbono livre e baixo oxigênio dissolvido, foram importantes para alterar a toxicidade do citral nos meses de 2011-2012, foi visto que quando a temperatura da água foi maior, como no verão, a toxicidade do citral aumentou, e no inverno diminuiu, mostrando que o citral em altas temperaturas foi mais solúvel causando uma mortalidade maior das larvas cercárias. Assim, foi observado que fatores abióticos alteram a toxicidade *in vitro* e *in vivo* do citral.

Existem alguns estudos feitos com o óleo essencial capim-limão sobre protozoários como a *Leishmania* spp. (MACHADO et al., 2012), *Trypanossoma brucei* e *Plasmodium falciparum* (KPOVIESSI et al. 2014), além de *Haemonchus contortus in vitro* e *in vivo* (MACEDO et al., 2015).

Com o óleo essencial de citronela, foram encontrados apenas testes envolvendo *Rhipicephalus microplus* (MELLO et al., 2014), *Dermacentor reticulatus* (ŠTEFANIDESOVÁ et al., 2017), e o estudo de Rodrigues et al.

(2013) sobre atividade moluscicida (*Biomphalaria glabrata*) e larvicida (*Artemia salina*).

### 4.3 Avaliação histológica

A análise histológica foi realizada após as 15 h de análise, a Tabela 6 mostra a comparação dos resultados da histologia obtidos após este tempo de análise comparando com a motilidade obtida também neste mesmo tempo.

TABELA 6 – Comparação da motilidade da *F. hepatica* após as 15 h com a análise histológica.

		Capim-limão			Citral			Citronela			C-
T	C	0,025 <sup>a</sup>	0,05 <sup>a</sup>	0,1 <sup>a</sup>	0,025 <sup>a</sup>	0,05 <sup>a</sup>	0,1 <sup>a</sup>	0,025 <sup>a</sup>	0,05 <sup>a</sup>	0,1 <sup>a</sup>	
15 h	M0	8*	8*	8*	8*	8*	8*	4*	8*	8*	0*
	M1	0*	0*	0*	0*	0*	0*	4*	0*	0*	3*
	M2	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	4*
	M3	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	1*
AH		ACT	ACT	ACT	TE	ACT	ACT	EI	ACT	ACT	EI MT I.

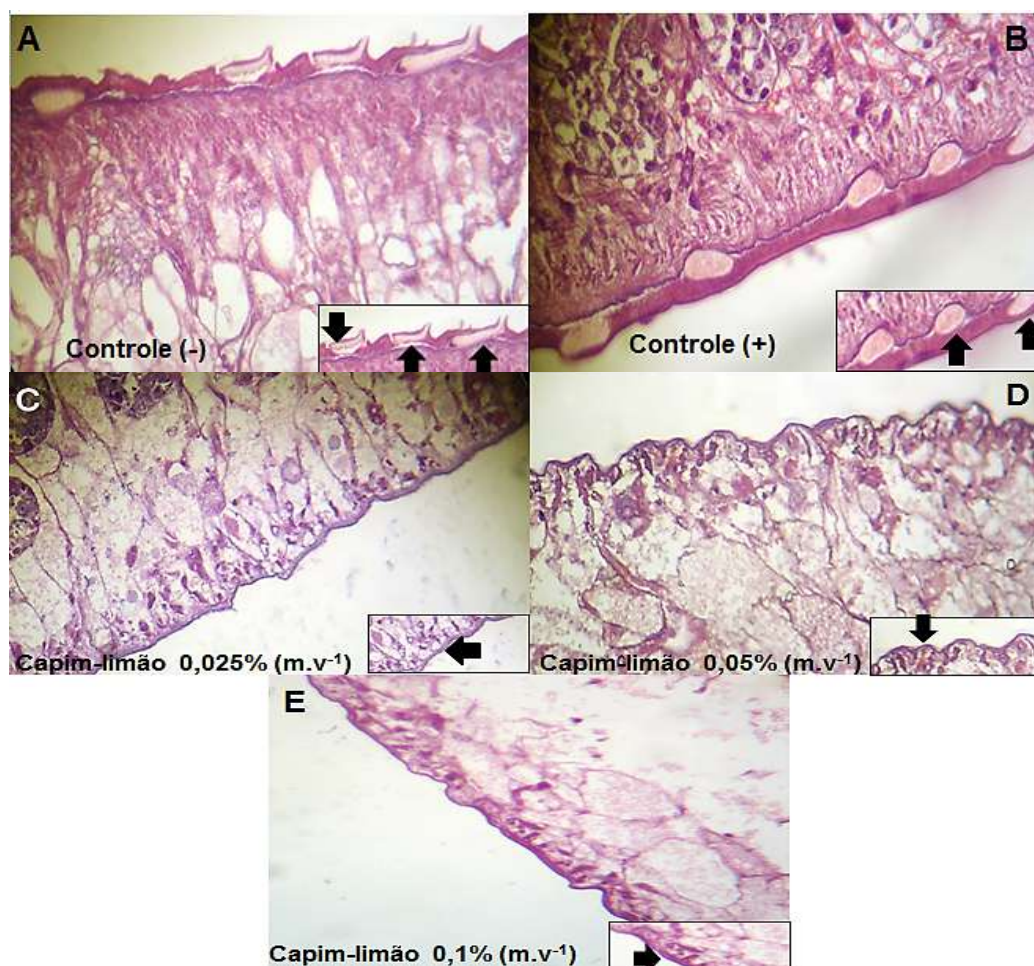
T = tempo; AH = Análise histológica. C- = Controle negativo. \*Quantidade de exemplares enquadradas no critério utilizado. <sup>a</sup> = concentração em % (m v<sup>-1</sup>). ACT = Ausência de uma das camadas do tegumento. TE = Tegumento com espinhos. EI = Espinhos internalizados. EIMTI = Espinhos íntegros, multifocais e em moderada quantidade, tegumento íntegro.

Interpretando a Tabela 6 e comparando com as lâminas obtidas, observa-se que na análise da lâmina do controle negativo na porção A (Figura 5 A), B e C os espinhos apresentaram-se íntegros, multifocais e em moderada quantidade e com preservação do tegumento. No controle positivo na parte A (Figura 5 B) e B os espinhos apresentaram-se multifocais em moderada quantidade e internalizados, e na porção C os espinhos apresentaram-se multifocais e discretos. Observa-se que no controle positivo, o tegumento estava presente, de acordo com o estudo *in vivo* de Tonner et al.

(2011) o tegumento começa a sofrer alterações utilizando o triclabendazole (TCBZ) entre 48 e 72 horas.

Um aspecto importante a ser considerado é que, o óleo essencial de capim-limão em todas concentrações (Figura 5 - C, D e E), citral 0,05% ( $\text{m v}^{-1}$ ) (Figura 6 – D) e 0,1% ( $\text{m v}^{-1}$ ) (Figura 6 – E), e o óleo essencial de citronela nas concentrações 0,05% ( $\text{m v}^{-1}$ ) (Figura 7 - D) e 0,1% ( $\text{m v}^{-1}$ ) (Figura 7 – E) apresentaram ausência de uma das camadas do tegumento após as 15 h de análise, mostrando assim que este tegumento foi perdido antes de 48 h, no estudo feito por Toner et al. (2011) foi relatado que o TCBZ começa a fazer ação sobre o tegumento entre 48 e 72 h o que nos sugere que este óleos citados e o citral apresentaram ação superior ao TCBZ, apesar de ser um teste *in vitro*.

Figura 5 – Análise histológica de adultos de *Fasciola hepatica* no aumento de



40X mantidas *in vitro* por 15h com o controle (-) (A), controle positivo (B), óleo essencial de capim-limão nas concentrações de 0,025; 0,05 e 0,1 % ( $\text{m v}^{-1}$ ). A figura A mostra o tegumento com espinhos íntegros (setas). A figura B mostra o tegumento com espinhos internalizados (setas). Nas figuras C, D e E mostra o tegumento com ausência de espinhos (setas).



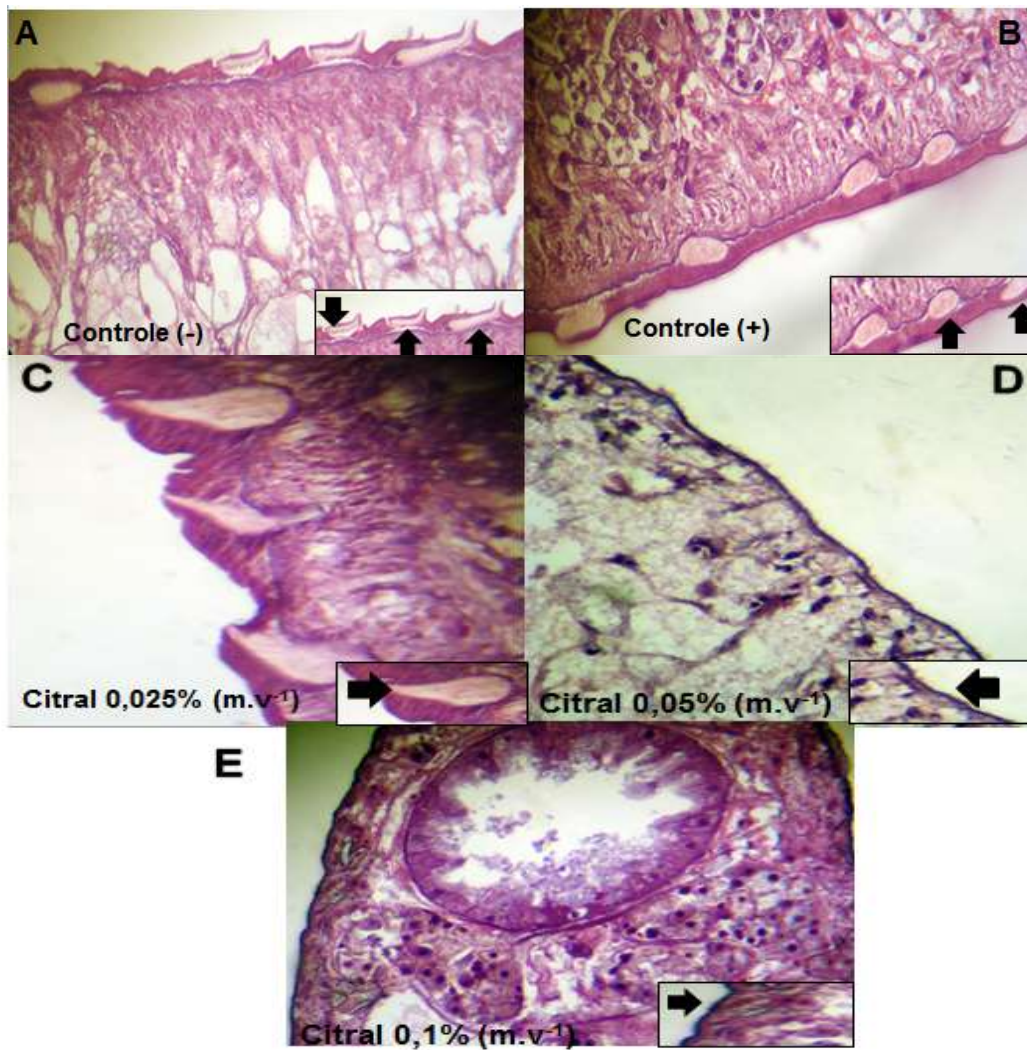


Figura 6 - Análise histológica de adultos de *Fasciola hepatica* no aumento de 40X mantidas *in vitro* por 15h com o controle (-) (A), controle positivo (B), componente majoritário citral nas concentrações de 0,025; 0,05 e 0,1 % ( $m \cdot v^{-1}$ ). A figura A mostra o tegumento com espinhos íntegros (setas). A figura B mostra o tegumento com espinhos internalizados (setas). A figura C mostra o tegumento com espinhos (setas), e a D e E mostra o tegumento com ausência de espinhos (setas).

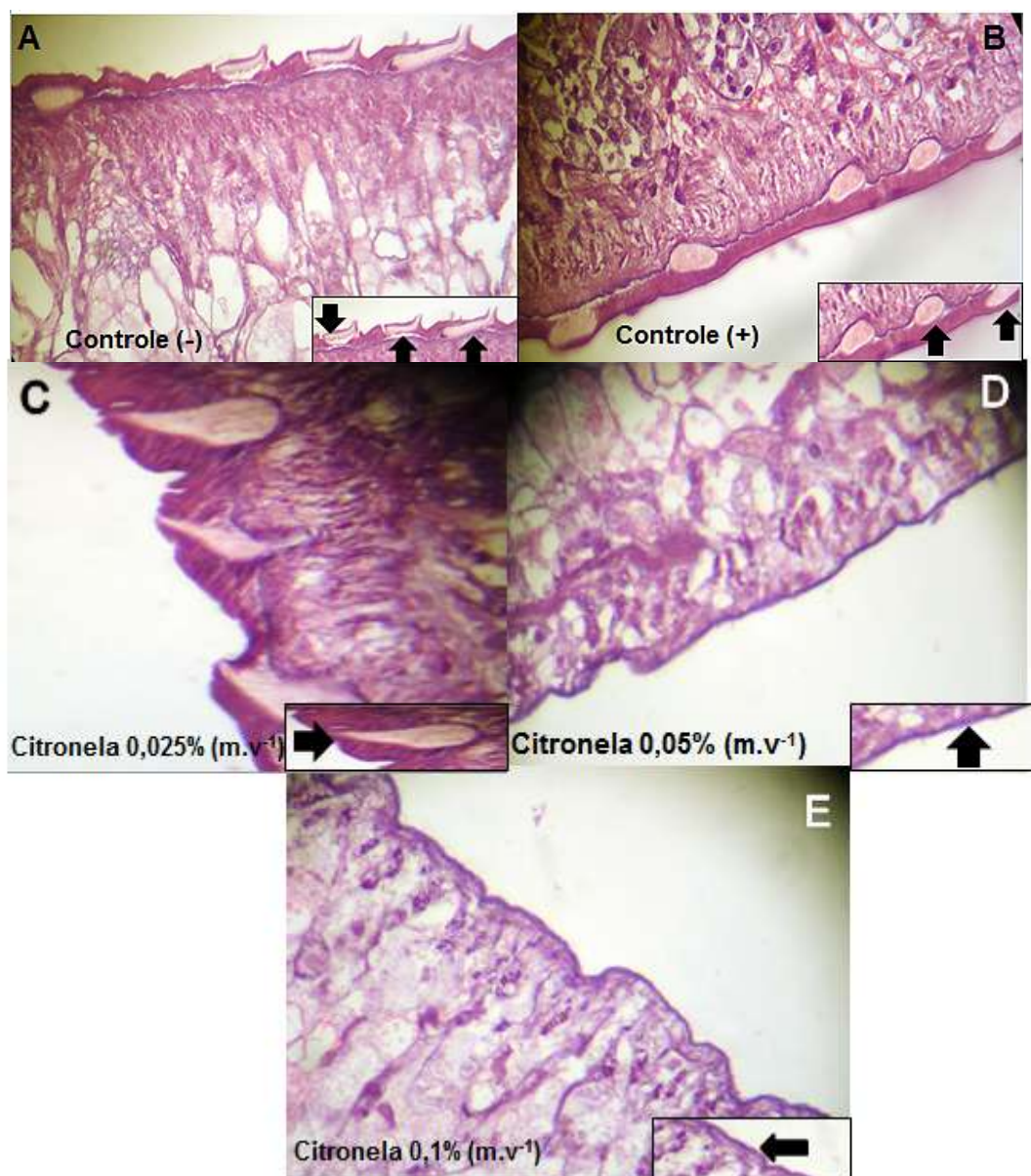


Figura 7 - Análise histológica no aumento de 40X de adultos de *Fasciola hepatica* mantidas *in vitro* por 15h com o controle (-) (A), controle positivo (B), óleo essencial de citronela nas concentrações de 0,025; 0,05 e 0,1 % ( $m.v^{-1}$ ). A figura A mostra o tegumento com espinhos íntegros (setas). A figura B mostra o tegumento com ausência de espinhos (setas). A figura C mostra o tegumento com espinhos (setas), e a D e E mostra o tegumento com ausência de espinhos (setas).

Além disso, estes óleos e o citral também apresentaram diferenças (espinho e tegumento) em relação ao controle negativo, comprovando mais uma vez sua ação. Outro ponto importante é que o citral e o óleo essencial de citronela na concentração de 0,025% ( $m.v^{-1}$ ) apresentaram espinhos internalizados (Figura 7 – C) semelhante ao observado no controle positivo

(Figura 7B).

Com base nos achados histológicos observados, a perda do tegumento e dos espinhos foram os aspectos que mais se destacaram nas ações dos agentes testados. O corpo da *F. hepatica* é recoberto por espinhos direcionados no sentido posterior que tem a função de auxiliar na manutenção da posição do trematódeo, e possivelmente na sua nutrição ao causar a lesão no epitélio e está relacionado ainda à patogenicidade do parasito (BOWMAN, 2003; OLIVEIRA, 2008).

## 5. CONCLUSÃO

O óleo essencial de capim-limão e seu majoritário (cital) interferiram na motilidade da *F. hepatica*, em todas as concentrações testadas, e mantiveram este resultado desde o tempo inicial até o final da análise.

Enquanto o óleo essencial de citronela a 0,1% (m v<sup>-1</sup>) inibiu apenas a motilidade da *F. hepatica* após 12 h de análise, o óleo essencial de capim-limão e o citral nas concentrações mais altas promoveram ainda a perda de uma das partes do tegumento.

Embora o óleo essencial de capim-limão e seu constituinte majoritário (cital) tenham apresentado melhor eficiência no controle de *F. hepatica*, novos estudos devem ser realizados para comprovar a ação *in vivo* destes produtos naturais.

## 6. REFERÊNCIAS

ABDEL-GHAFFAR, F.; SEMMLER, M.; AL-RASHEID, K. S.; STRASSEN, B.; FISCHER, K.; AKSU, G.; KLIMPEL, S.; MEHLHORN, H. The effects of different plant extracts on intestinal cestodes and on trematodes. **Parasitology Research**. v. 108, n. 4, p. 979-984, 2011.

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonoses and communicable diseases common to man and animals**. v. 3. n. 580. 3. ed. Washington: Pan American Health Organization, 2003.

ADDAMS, R. P. **Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Carol Stream: Allured, 2007, 804p.

AHMAD, A.; VILJOEN, A. The in vitro antimicrobial activity of *Cymbopogon* essential oil (*lemon grass*) and its interaction with silver ions. **Phytomedicine**. n. 6. p. 657, 2015.

ALEIXO, M. A.; FREITAS, D. F.; DUTRA, L. D.; MALONE, J.; MARTINS, I. V. F.; MOLENTO, M. B. *Fasciola hepatica*: epidemiology, perspectives in the diagnostic and the use of geoprocessing systems for prevalence studies. **Seminars: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 3, 2015.

ARAÚJO, S. M de.; PILE, E. A. M.; BARROS, J. S de.; SANTOS, J. A. A dos.; VASCONCELLOS, M. C. Alterações histológicas em *Lymnaea columella* provocadas pelo látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopilii*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, n. 3, p. 157-159, 2002.

ARAÚJO, J.L.B.; LINHARES, G. F. C.; OLIVEIRA, A. P. M.; AMORIL, J. G.; FREITAS, M. R.; COSTA, I. C.; PINHEIRO, V. J. L.; ESSELIN, I. R. R.; REIS, S. A. Infecções autóctones de bovinos por *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 (Trematoda, Fasciolidae) no Estado de Goiás, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v.36, n.1, p. 96-100, 2007.

AVELAR, B. R de.; FREITAS, D. F.; CARNEIRO, M. B.; MARTINS, I. V. F. Práticas de Manejo no Controle da Infecção por *Fasciola hepatica* em bovinos. In: STRADIOTTI JÚNIOR, D.; DELPRETE, S. E.; CÓSER, A. C.; TAVARES, C. F. Organizadores. **Zootecnia Intinerante I**. Alegre: CAUFES, 2013. p. 59-76.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - A review. **Food Chemical Toxicology**. v. 46, p. 446-475, 2008.

BARBETTA, P. A. **Estatística aplicada às Ciências Sociais**. 4 ed. Florianópolis: Ed. da UFSC, 2001.

BEESELEY, N. J.; WILLIAMS, D. J. L.; PATERSON, S.; HODGKINSON. *Fasciola hepatica* demonstrates high levels of genetic diversity, a lack of population structure and high gene flow: possible implications for drug

resistance. **International Journal for Parasitology**. v. 47. ed. 1, p. 11-20, 2017.

BENETI, S. C.; ROSSET, E.; CORAZZA, M. L.; FRIZZO, C. D.; LUCCIO, M. D.; OLIVEIRA, J. V. Fractionation of citronella (*Cymbopogon winterianus*) essential oil and concentrated orange oil phase by batch vacuum distillation. **Journal of Food Engineering**. v. 102. n. 4, p. 348-354, 2011.

BENNEMA, S.; VERCRUYSSSE, J.; CLAEREBOU, E.; SCHNIEDER, T.; STRUBE, C.; DUCHEYNE, E.; HENDRICKX, G.; CHARLIER, J. The use of bulk-tank milk elisas to assess the spatial distribution of fasciola hepatica, ostertagia ostertagi and dictyocaulus viviparus in dairy cattle in flanders (belgium). **Veterinary Parasitology**. n. 165, p. 51–57, 2009.

BENNEMA, S. C.; SCHOLTE, R. G. C.; MOLENTO, M. B.; MEDEIROS, C.; CARVALHO, O. dos S. C. *Fasciola hepatica*: in bovines in Brazil: Data availability and spatial distribution. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 56, n. 1, 2014.

BERNADO, C. C.; CARNEIRO, M. B.; AVELAR, B. R.; DONATELE, D. M.; MARTINS, I. V. F.; PEREIRA, M. J. S. Prevalence of Liver Condensation due to Bovine Fasciolosis in Sourthen Espírito Santo: Temporal Distribution and Economic Losses. **Revista Brasileira de Parasitologia Veerínária**. v. 20, n. 1, p. 49-53, 2011.

BERNARDO, C. C.; AVELAR, B. R. de; IGNACCHITI, M. D. C.; MARTINS, I. V. F.; PEREIRA, M. J. S. Commercial ELISA® kit for detection of coproantigen and coproparasitological method in bovine livers with fascioliasis convicted. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, n.11, p. 37-40, 2012.

BERNARDO, C. C.; AVELAR, B. R.de; IGNACCHITI, M. D. C.; MARTINS, I. V. F.; PEREIRA, M. J. S. Comparação de kits ELISA® comerciais para anticorpos no soro e leite com um teste coproparasitológico em bovinos naturalmente infectados por *Fasciola hepatica*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 33. n. 1, p. 37-40, 2013.

BOUKHATEM, M. N.; FERHAT, M. A.; KAMELI, A.; SAIDI, F.; KEBIR, H. T. Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs. **Lybian Journal of Medicine**. v. 9. P. 25431, 2014.  
BOWMAN, D. D. **Georgie's Parasitology for Veterinarians**. 8 th edition. USA: Elsevier, 2003.

BOWMAN, D. D. **Parasitologia Veterinária de Georgis**. 9 ed. Philadelphia: WB Saunders, 2010. 448p.  
BRASIL. 2007. **ABIMA**, Resolução nº. 2, de 15 de janeiro de 2007.

CAREY, Francis A. **Química Orgânica**, v. 2, 7ed. Porto Alegre, AMGH, 2011.

CARNEIRO, M. B.; ALVES, D. P.; DONATELE, D. M.; PEREIRA JÚNIOR, O. S. P.; MARTINS, I. V. F. *Fasciola hepatica* em ovinos, caprinos e bubalinos em

municípios do sul do Espírito Santo. **Arquivo do Instituto Biológico São Paulo**. v. 80., n. 4, p. 442-446, 2013.

CUNHA, F. O. V.; MARQUES, S. M. T.; MATTOS, M. J. T. Prevalence of slaughter and liver condemnation due to *Fasciola hepatica* among sheep in the state of Rio Grande do Sul, Brazil 2000 and 2005. **Parasitologia Latinoamericana**, v.62, n.4, p.188-191, 2007.

D'ALMEIDA, S. C. G.; LORENZONI, P. de O.; MARTINS, I. V. F. Lymnaea e fasciolose: aspectos biológicos e estudos experimentais de dessa relação. **Tópicos Especiais em Ciência Animal**. Espírito Santo: CCAUFES, 366p., 2014.

DELETRE, E.; CHANDRE, F.; WILLIAMS, L.; DUMÉNIL, C.; MENUT, C.; MARTIN, T. Electrophysiological and behavioral characterization of bioactive compounds of the *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon winterianus*, *Cuminum cyminum* and *Cinnamomum zeylanicum* essential oils against *Anopheles gambiae* and prospects for their use as bednet treatments. **Parasites & Vectors**. v. 8, n. 316, 2015.

DENNIS, W. R.; STONE, W. M.; SWANSON, L. E. A new laboratory and field diagnostic test for fluke ova in feces. **Journal of American Veterinary Medical Association**. v. 124, p. 47-50, 1954.

FAIRWEATHER, I. Reducing the future threat from (liver) fluke: realistic prospect or quixotic fantasy. **Veterinary Parasitology**, v.180, p.133-143, 2011.

FAIRWEATHER, I. Triclabendazole: new skills to unravel an old (ish) enigma. **Journal of Helminthology**. v. 79, p. 227-234, 2005.

FAIRWEATHER, I., MCSHANE, D. D., SHAW, L., ELLISON, S. E., O'HAGAN, N. T., YORK, E. A., BRENNAN, G. P. Development of an egg hatch assay for the diagnosis of triclabendazole resistance in *Fasciola hepatica*: Proof of concept. **Veterinary Parasitology**, v.183(3),p. 249-259,2012.

FOREYT, W.J. **Parasitologia Veterinária: manual de referência**. 5.ed. São Paulo: Roca, 2005.

FORNARI, T.; VICENTE, G.; VÁSQUEZ, E.; GARCÍA-RISCO, M. R.; REGLERO, G. Isolation of essential oil from diferente plants and herbs by supercritical fluid extraction. **Journal of Chromatografy A**. v.1250, p. 34-48, 2012.

FRANZIOS, G.; MIROTSOU, M.; HATZIAPOSTOLOU, E.; KRAL, J.; SCOURAS, Z.G.; MAVRAGANIT-SIPIDOU, P. Insecticidal and genotoxic activities of mint essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 2690-2694, 1997.

GBENOU, J. D.; AHOUNOU, J. F.; AKAKPO, H. B.; LALEYE, A.; YAYI, E.; GBAGUIDI, F.; BABA-MOUSSA, L.; DARBOUX, R.; DANSOU, P.;



MOUDACHIROU, M.; KOTCHONI, S. O. Phytochemical composition of *Cymbopogon citratus* and *Eucalyptus citriodora* essential oils and their anti-inflammatory and analgesic properties on Wistar rats. **Molecular Biology Reports**, v. 40, n. 2, p. 1127-1134, 2013.

GIRÃO, E. S.; UENO, H. Técnica de quatro tamises para o diagnóstico coprológico quantitativo da Fasciolose dos ruminantes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.20, n.8, p. 905-912, 1985.

GOLDEN, O.; FLYNN, R. J.; READ, C.; DONNELLY, S. M.; STACK, C.; DALTON, J. P.; MULCAHY, G. Protection of cattle against a natural infection of *Fasciola hepatica* by vaccination with recombinant cathepsin L1 (rFhCL1). **Vaccine**, v. 28, p. 5551-5557, 2010.

GOMES, Maria José Batista. **Prevalência e perdas econômicas por *Fasciola hepatica* em bovinos abatidos em matadouros/frigoríficos do litoral norte do RS**. 2014. Especialização em Produção, Tecnologia e Higiene de Alimentos de Origem Animal - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2014. Disponível em: <<  
<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/127066/000973881.pdf?sequence=1> >>. Acesso em: 29 fev 2016.

GUEDES, R. A.; MARQUES, L. T.; NOVAES, M. T.; MARTINS, I. V. F. Revisão e atualização da situação da fasciolose bovina no Espírito Santo. Revisão e atualização da situação da fasciolose bovina no Espírito Santo. In: MARTINS, C. B.; DEMINICIS, B. B.; MOREIRA, G. R.; MENDONÇA, P. P., Organizadores. Tópicos especiais em ciência animal IV. Alegre: CAUFES I, 2016. p. 162-182. GUEDES, R. A. Composição química de extratos vegetais. 2017. 70p. Dissertação. Universidade Federal do Espírito Santo. Alegre.

GUIMARÃES, A. G.; QUINTANS, J. S. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Monoterpenes with analgesic activity a systematic review. **Phytotherapy Research**. v. 27, n. 1, p. 1–15, 2013.

GUIMARÃES, L. G. de L.; CARDOSO, M. das G.; ZACARONI, L. M.; LIMA, R. K de.; PIMENTEL, F. A.; MORAIS, A. R de. Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC) STAPF). v. 31, n. 6, p. 147601480, 2008.

HENKER, L. C.; SCHWERTZ, C. I.; LUCCA, N. J.; PIVA, M. M.; PRIOR, K. C.; BASKA, P.; MORESCO, R. N. Immune protection conferred by recombinant MRLC (myosin regulatory light chain) antigen in TiterMax Gold® adjuvant against experimental fasciolosis in rats. **Vaccine**, v. 35, n. 4, p. 663-671, 2017.

HOWELL, A.; BAYLIS, M.; SMITH, R.; PINCHBECK, G.; WILLIAMS, D. Epidemiology and impact of *Fasciola hepatica* exposure in high-yielding dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 121, p. 41-48, 2015.

JAROS, S.; JAROS, D.; WESOŁOWSKA, A.; ZYGNER, W.; WEDRYCHOWICZ, H. Blocking *Fasciola hepatica*'s energy metabolism – a pilot

study of vaccine potential of a novel gene – phosphoglycerate kinase. **Veterinary Parasitology**. v. 172, p. 229-237, 2010.

JEYATHILAKAN, N.; MURALI, K.; ANADARAJ, A.; LATHA, B. R.; ABDUL BASITH, S. Anthelmintic activity of essential oils of *Cymbopogon nardus* and *Azadirachta indica* on *Fasciola gigantica*. **Veterinary e Animal Sciences**, v. 6, p. 204-209, 2010.

KEELEY, J. M.; ELLIOTT, T. P.; BEDDOE, T.; ANDERSON, G.; SKUCE, P.; SPITHILL, T. W. Current Threat of Triclabendazole Resistance in *Fasciola hepatica*. **Trends in Parasitology**. v. 32. ed. 6, p. 458-469, 2016.

KIUCHI, F.; MIYASHITA, N.; TSUDA, Y.; KONDO, K.; YOSHIMURA, H. Studies on Crude Drugs Effective on Visceral Larva Migrants I. Identification of Larvicidal Principles in Betel Nuts. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v. 35, 1987.

KOREMBLUM, A.; GOULART, F. R. de V.; RODRIGUES, I de A.; ABREU, F.; LINS, U.; ALVES, P. B.; BLANK, A. F.; VALONI, É.; SEBÁSTIAN, G. V.; ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S.; SELDIN, L. Antimicrobial action and anti-corrosion effect against sulfate reducing bacteria by lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil and its major component, the citral. **AMB Express**. v. 3. n. 44. p. 2-8, 2013.

KPOVIESSI, S.; BERO, J.; AGBANI, P.; GBAGUIDI, F.; KPOVIESSI, B. K.; SINSIN, B.; ACCROMBESSI, G.; FRÉDÉRICH, M.; MOUDACHIROU, M.; LECLECQ, J. Q. Chemical composition, cytotoxicity and *in vitro* antitrypanosomal and antiplasmodial activity of the essential oils of four *Cymbopogon* species from Benin. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 151, ed. 1, p. 652-659, 2014.

KUERPICK, B.; FIEDOR, C.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; SCHNIEDER, T.; STRUBE, C. Bulk milk-estimated seroprevalence of *Fasciola hepatica* in dairy herds and collecting of risk factor data in East Frisia, Northern Germany. **Berline und Münchener Tierärztliche**. n. 125, p. 345–350, 2012.

KURITA, N.; MIYAJI, M.; KURANE, R.; TAKAHARA, Y. Antifungal activity of components of essential oils. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.45, n. 4, p. 945-952, 1981.

LARA JÚNIOR, C.R.; OLIVEIRA, G.L.; MOTA, B.C.F.; FERNANDES, M.F.G.; FIGUEIREDO, L.S.; MARTINS, E.R.; MOREIRA, D,L,M.; KAPLAN, M.A.C. Antimicrobial activity of essential oil of *Piper aduncum* L. (Piperaceae) . **Journal of Medicinal Plants Research**. v.6, p. 3800-3805, 2012.

LEITE, B. L. S.; BONFIM, R. R.; ANTONIOLLI, A. R.; THOMAZZI, S. M.; ARAÚJO, A. A.; BLANK, A. F. ESTEVAM, C. S.; CAMBUI, E. V.; BONJARDIM, L. R.; ALBUQUERQUE JÚNIOR, R. L.; QUINTANS-JÚNIOR L. J. Assessment of antinociceptive, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Cymbopogon winterianus* leaf essential oil. **Pharmaceutical Biology**. v. 48, n. 10, p. 1164–1169, 2010.



LIMA, W. S.; SOARES, L. R. M.; BARÇANTE, T. A.; GUIMARAES, M. P.; BARÇANTE, J. M. P. Occurrence of *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) infection in Brazilian cattle of Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 18, n. 1, 2009.

LORENZO, D.; DELLACASSA, E.; ATTI-SERAFINI, L.; SANTOS, A. C.; FRIZZO, C.; PAROUL, N.; MOYNA, P.; MONDELLO, L.; DUGO, G. Composition and stereoanalysis of *Cymbopogon wynterianus* Jowitt oil from Southern Brazil. **Flavour and Fragrance Journal**. v. 15, p. 177-181, 2000.

LUNA, L. G. Manual of Histologic Staining of the Armed Forces Institute of Pathology. 3rd ed. McGraw-Hill, New York, p. 258.

MACEDO, I. T. F.; OLIVEIRA, L. M. B. de.; RIBEIRO, W. L. C.; SANTOS, J. M. L.; SILVA, K. das C.; ARAÚJO FILHO, J. V. de.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; CAMURÇA-VASCONCELOS; BEVILAQUA, C. M. L. Anthelmintic activity of *Cymbopogon citratus* against *Haemonchus contortus*. **Brazil Journal Veterinary Parasitology**. v. 24, p. 268-275, 2015.

MACHADO, M.; PIRES, P.; DINIS, A. M.; SANTOS-ROSA, M.; ALVES, V.; SALGUEIRO, L.; CAVALEIRO, C.; SOUSA, M. C. Monoterpenic aldehydes as potential anti-Leishmania agents: Activity of *Cymbopogon citratus* and citral on *L. infantum*, *L. tropica* and *L. major*. **Experimental Parasitology**, v. 130, ed.3, p. 223-231, 2012.

MARQUES, C. R. G.; MIKAMI, A. Y.; PISSINATI, A.; PIVA, L. B.; SANTOS, L. J. A. P. S.; VENTURA, M. U. Mortality *Alphitobius diaperinus* (Panzer)(Coleoptera: Tenebrionidae) by neem and citronella oils. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 6, p. 2565-2574, 2013.

MARQUES, L. T. Composição química de extratos vegetais e sua eficácia no controle *in vitro* de ovos de *Fasciola hepatica*. 2017. 61p. Dissertação. Universidade Federal do Espírito Santo. Alegre. 2017.

MARTINS, I. V. F.; AVELAR, B. R. de.; PEREIRA, M. J. S.; FONSECA, A. H. Application of a geographical information system approach for risk analysis of fascioliasis in southern Espírito Santo state, Brazil. **Geospatial Health**, v. 6, n. 3, p. 87-93, 2012.

MARTINS, I. V. F.; BERNARDO, C. C.; AVELAR, B. R. de.; ARAÚJO, I. B. B. A.; DONATELE, D. M.; NUNES, L. C. Sensibilidade e reprodutibilidade da técnica de sedimentação (FOREYT, 2005) para o diagnóstico de *Fasciola hepatica*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 17, supl. 1, p. 110-112, 2008.

MARTINS, I. V. F.; PEREIRA, B. J.; LIMA, V. R.; BERNARDO, C. das C. Caderno de Parasitologia Veterinária. Edufes: Alegre, 2007, 114p.

MASSOUD, A. M.; SHALABY, H. A.; EL KHATEEB, R. M.; MAHMOUD, M. S.; KUTKAT, M. A. Effects of Mirazid® and myrrh volatile oil on adult *Fasciola*

*gigantica* under laboratory conditions. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. 875-884, 2012.

MCCANN, C. M.; BAYLIS, M.; WILLIAMS, D. J. L. The development of linear regression models using environmental variables to explain the spatial distribution of *Fasciola hepatica* infection in dairy herds in England and Wales. **International Journal for Parasitology**. n. 40, p. 1021–1028, 2010.

MELLO, V de.; PRATA, M. C.; SILVA, M. R. da.; DAEMON, E.; SILVA, L. S da.; GUIMARÃES, F de G.; MENDONÇA, A. E de.; FOLLY, E.; VILELA, F. M.; CABRAL, L. M.; AMARAL, M da P. Acaricidal properties of the formulations based on essential oils from *Cymbopogon winterianus* and *Syzygium aromaticum* plants. **Parasitology Research**. v. 113, n. 12, p. 4431-4437, 2014.

MENDES, Eveline Albuquerque. Comportamento e desenvolvimento de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) de bovinos naturalmente infectados em sagüi (*Callithrix penicillata*) e gerbil (*Meriones unguiculatus*). 2006. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Parasitologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo horizonte, 2006. Disponível em: << <http://www.parasitologia.icb.ufmg.br/defesas/247M.PDF> >>. Acesso em: 28 fev 2016.

MENEZES, I. A. C de.; MOREIRA, Í. J. A.; de PAULA, J. W. A.; BLANK, A. F.; ANTONIOLLI, A. R.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; SANTOS, M. R. Cardiovascular effects induced by *Cymbopogon winterianus* essential oil in rats: involvement of calcium channels and vagal pathway. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. V. 62. n. 2, p. 215–221, 2010.

MERCADO, J. M. A.; VELARDE, F. I.; DÍAZ, M. A. A.; MONTENEGRO, Y. V.; ACEVEDO, J. G. A.; BORES, A. M. G. *In vitro* antihelmintic effect of fifteen tropical plant extracts on excysted flukes of *Fasciola hepatica*. **BMC Veterinary Research**. v. 11. n. 45, p. 1-6, 2015.

MEZO, M.; GONZALEZ-WARLETA, M.; ANTONIO CASTRO-HERMIDA, J.; UBEIRA, F.M. Evaluation of the flukicide treatment policy for dairy cattle in Galicia (NW Spain). **Veterinary Parasitology**. v. 157, p. 235–243, 2008.

MOAZENI, M.; ARDAKANI, Z. S. S.; SAHARKHIZ, M. J.; JALAEI, J.; KHADEMOLHOSEINI, A. A.; ABAD, S. S. E.; ALAVI, A. M. In vitro ovicidal activity of *Peganum harmala* seeds extract on the eggs of *Fasciola hepatica*. **Journal of Parasitic Diseases**. p. 1-6, 2016.

MOAZENI, M.; KHADEMOLHOSEINI, A. A. Ovicidal effect of the methanolic extract of ginger (*Zingiber officinale*) on *Fasciola hepatica* eggs: an in vitro study. **Journal of parasitic diseases**. v. 40, n. 3, p. 662-666, 2016.

MONTENEGRO, Y. V.; VELARDE, F. I.; AVILA, G. R.; XOCHIHUA, J. M. *In vitro* Fasciolicide Activity of Some Plant Extracts Against Newly Excysted Flukes. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 1149. p. 180-182, 2008.

MORAIS, L.A.S. DE. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, S4050-S4063, 2009.

NERIO, L.S.; OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E. Repellent activity of essential oils: A review. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 372-378, 2010.

NOVAES, M.,T.; BITENCOURT, G.,F.; MARQUES, L.,T., MARTINS, I. V. F. Epidemiologia da fasciolose bovina no Sul do Espírito Santo. **XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária**, 2016.

OLIVEIRA, E. L de. Prevalência e fatores associados à distribuição da *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 em bovinos dos municípios de Careacú e Itajubá, região da bacia do Rio Sapucaí, Minas Gerais. 2008. 101p. Dissertação. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2008.

OLIVEIRA, G.L.; CARDOSO, S.K.; LARA JUNIOR, C.R.; VIEIRA, T.M.; GUIMARÃES, E.F.; FIGUEIREDO, L.S.; MARTINS, E.R.; MOREIRA, D.L.; KAPLAN, M.A.C. Chemical study and larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oil of *Piper aduncum* L. (Piperaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 85, p. 1227-1234, 2013.

OLIVEIRA, G. L.; VIEIRA, T. M.; NUNES, V. F.; RUAS, M. de O.; DUARTE, E. R.; MOREIRA, D. de L.; KAPLAN, M. A. C.; MARTINS, E. R. Chemical composition and efficacy in the egg-hatching inhibition of essential oil of *Piper aduncum* against *Haemonchus contortus* from sheep. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 24. n. 3, p. 288-292, 2014.

OLIVEIRA, W. A. de; PEREIRA, F. de O.; de LUNA, G. C. D. G.; LIMA, I. O.; WANDERLEY, P. A.; de LIMA, R. B.; LIMA, E. de O. Antifungal activity of *Cymbopogon winterianus jowitt* ex bor against *Candida albicans*. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 42. n. 2, p.433-441, 2011.

ORTIZ, R. S.; MARRERO, G. V.; NAVARRO, A. L. T. Instructivo técnico para el cultivo de *Cymbopogon citratus* (DC). Stapf (Caña Santa). **Revista Cubana de Plantas Medicinai**s, La Habana, v. 7, n. 2, p. 89-95, 2002.

OWAMAH, H. I.; ALFA, M. I.; DAHUNSI, S. O. Optimization of biogas from chicken droppings with *Cymbopogon citratus*. **Renewable Energy**. v. 68, p. 366-371, 2014.

PARANAGAMA, P. A. **Analysis of Sri Lankan Essential Oils by Gas Chromatography and Mass Spectroscopy**. ed. Senanayake, U.M. Colombo, Sri Lanka: Industrial Technology Institute, 1991.

PEREIRA, C. A. J.; OLIVEIRA, L. L. S.; COAGLIO, A. L.; SANTOS, F. S. O.; CEZAR, R. S. M.; OLIVEIRA, F. L. P.; CONZENZA, G.; LIMA, W. S. Anti-helminthic activity of *Momordica charantia* L. against *Fasciola hepatica* eggs

after twelve days of incubation *in vitro*. **Veterinary Parasitology**. v. 228, p. 160-166, 2016.

PEREIRA, F. de O.; WANDERLEY, P. A.; VIANA, F. A. C.; LIMA, R. B. de.; SOUSA, F. B. de.; SANTOS, S. G. dos.; LIMA, E. de O. Effects of *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor essential oil on the growth and morphogenesis of *Trichophyton mentagrophytes*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 47, n. 1, 2011.

PEREZ, D. R.; PÉREZ, J. M. M.; VÁZQUEZ, F. A. R.; VALLADARES, M. M. The diagnosis of fasciolosis in feces of sheep by means of a PCR and its application in the detection of anthelmintic resistance in sheep flocks naturally infected. **Veterinary Parasitology**. v. 197. ed. 1-2. p. 277-282, 2013.

PILE, E.; GAZETA, G.; SANTOS, J. A. A.; COELHO, B.; SERRA-FREIRE, N. M. Ocorrência de fascioliasis humana no município de Volta Redonda, RJ, Brasil. **Revista de Saúde Pública**. v. 34. n. 4, p. 413-414, 2000.

PILE, E.; SANTOS, J. A. A.; PASTORELLO, T.; VASCONCELLOS, M.. *Fasciola hepatica* em búfalos (*Bubalus bubalis*) no município de Maricá, Rio de Janeiro, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.38, n.1, p.42- 43, 2001.

PINHEIRO, P. F.; QUEIROZ, V. T.; RONDELLI, V. M.; COSTA, A. V.; MARCELINO, T. P.; PRATISSOLI, D. Insecticidal activity of citronela grass essential oil on *Frankliniella schultzei* and *Myzus persicae*. **Ciências e agrotecnologia**, Lavras, v. 37, p. 138-144, 2013.

QUEIROZ, V. S.; LUZ, E.; LEITE, L. C.; LÍRIO, S. M. *Fasciola hepatica* (Trematoda, Fasciolidae): estudo epidemiológico nos municípios de Bocaiúva do Sul e Tunas do Paraná (Brasil). **Acta Biológica**. Paranaense, Curitiba, v. 31, n. 1-2-3-4, p. 99-111, 2002.

RODRIGUES, K. A. da F.; DIAS, C. N.; AMARAL, F. M. M. do.; MORAES, D. F. C.; FILHO, V. E. M.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. Molluscicidal and larvicidal activities and essential oil composition of *Cymbopogon wynterianus*. **Pharmaceutical Biology**. v. 51, n. 10, p. 1293-1297, 2013.

SALIMI-BEJESTANI, M. R.; MCGARRY, J. W.; FELSTEAD, S.; ORTIZ, P.; AKCA, A.; WILLIAMS, D. J. Development of an antibody-detection ELISA for *Fasciola hepatica* and its evaluation against a commercially available test. **Research in veterinary science**. v. 78. n. 2, p. 177-181, 2005.

SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; PAZ-SILVA, A.; SUÁREZ, J.; PANADERO, R.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONGO, P. Use of a sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay (SEA) for the diagnosis of natural *Fasciola hepatica* infection in cattle from Galicia (NW Spain). **Veterinary Parasitology**. v. 93, p. 34-46, 2000.

SANTOS, P. L.; ARAÚJO, A. A. S.; QUINTANS, J. S. S.; OLIVEIRA, M. G. B.; BRITO, R. G.; SERAFINI, M. R.; MENEZES, P. P.; SANTOS, M. R. V.; ALVES, P. B.; JÚNIOR, W. de L.; BLANK, A. F.; LA ROCCA, V.; ALMEIDA, R. N.; QUITANS-JÚNIOR, L. J. Preparation, Characterization, and Pharmacological Activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor (Poaceae) Leaf Essential Oil of  $\beta$ -Cyclodextrin Inclusion Complexes. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2015. p. 1-12, 2015.

SANTOS, T. R. B dos.; CASTRO, N. A de.; BRETANHA, L. C.; SCHUCH, L. F. D.; FREITAG, R. A.; NIZOLI, L. Q. Estudo *in vitro* da eficácia de citronela (*Cymbopogon wynterianus*) sobre carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Science and Animal Health**. v. 3. n. 1, p. 135-149, 2015.

SARGINSON, N. D.; SCOTT, P. R. Diagnosis and economic consequences of triclabendazole resistance in *Fasciola hepatica* in a sheep flock in south-east Scotland. **Veterinary Record**. v. 168. n.6, p.159-165, 2011.

SIANI, A. C.; SAMPAIO, A. L. F.; SOUZA, M. C. de.; HENRIQUES, M. das G. M. O.; RAMOS, M. F. de S. Óleos essenciais potencial anti-inflamatório. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. v. 16, p. 38-43, 2000.

SILVA, E. R. V.; CAPOANI, R. Q.; RITZ, R.; SURIAN, C. R. S.; NEVES, M. S. Fasciolose hepática. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. ano. VI. n. 11, 2008.

SILVA, R. E.; LIMA, W. S.; CALDAS, W. S.; CURY, M. C.; MALACCO, A. F. Primeiro encontro de *Lymnaea columela* (Say, 1817) naturalmente infectada por estádios intermediários de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) na cidade de Itajubá, MG. In: XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia. Góias, p.205, 1995.

SIMIC, A.; RANCCIC, A.; SOKOVIC, M. D.; RISTIC, M.; GRUJIC-JOVANOVIC, S.; VUKOJEVIC, J.; MARIN, P. D. Essential oil composition of *Cymbopogon wynterianus* and *Carum carvi*. and their antimicrobial activities. **Pharmaceutical Biology**. v. 46, n. 6, p. 437-441, 2008.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, E.V. Óleos Voláteis. In: **SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G., MELLO, J.P.C, MENTZ, L.A. E PETROVIK, P.R.** (Orgs). **Farmacognosia:da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis. Editora UFRGS/ Editora UFSC, p. 467-495, 2003.

SINGH, T. U.; KUMAR, D.; TANDAN, S. K.; MISHRA, S. K. Inhibitory effect of essential oils of *Allium sativum* and *Piper longum* on spontaneous muscular activity of liver fluke, *Fasciola gigantica*. **Experimental Parasitology**. v. 123. ed.4, p. 302-308, 2009.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**, v. 2. 10ed. Rio de Janeiro. LTC, 2013.

SONKER, N.; PANDEY, A. K.; SING, P.; TRIPATHI, N. N. Assessment of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf Essential Oil as Herbal Preservatives Based

on Antifungal, Antiaflatoxin, and Antiochratoxin Activities and *In Vivo* Efficacy during Storage. **Journal of Food Science**. v. 79, n.4, p. 628-634, 2014.

ŠTEFANIDESOVÁ, K.; ŠKULTÉTY, L.; SPARAGANO, O. A. E.; ŠPITALSKÁ, E. The repellent efficacy of eleven essential oils against adult *Dermacentor reticulatus* ticks. **Ticks and Ticks- borne diseases**. 2017.

SUNITA, K.; KUMAR, P.; SINGH, D. K. Seasonal variation in toxicity of citral against *Fasciola* larva. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. v. 4, supl. 2, p.584-588, 2014.

TESSELE, B.; BRUM, J. S.; BARROS, C. S. L. Lesões parasitárias encontradas em bovinos abatidos para consumo humano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. n. 33. v. 5. p. 873-889, 2013.

TONNER, E.; BRENNAN, G. P.; HANNA, R. E. B.; EDGAR, H. W. J.; FAIRWEATHER, I. *Fasciola hepatica*: time-dependent disruption of spermatogenesis following in vivo treatment with triclabendazole. **Parasitology Research**. v. 109, p. 1035-1043, 2011.

TORRES, G. M. ***Fasciola hepatica* em bovinos**. 2011. Monografia. Universidad Autonoma Agraria “Antonio Narro” Unidad Laguna, Coah, México. 2011. Disponível em: <<  
<http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/3238/GABRIEL%20DE%20MARCOS%20TORRES.pdf?sequence=1> >>. Acesso em: 29 fev 2016.

TRIVILIN, L. O.; SOUZA, D. R.; NUNES, L. C.; MARTINS, I. V. F. M. Imunofenotipagem da resposta inflamatória em fígados de bovinos cronicamente e naturalmente infectados por *Fasciola hepatica*. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**.v. 35, n. 1, p. 41-47, 2013.

TZORTZAKIS, N. G.; ECONOMAKIS, C. D. Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. **Innovative food science & emerging technologies**, v. 8, p. 253-258, 2007.

VELOSO, R. A.; CASTRO, H. G.; CARDOSO, D. P. CHAGAS, L. F. B.; CHAGAS JÚNIOR, A. F. Óleos essenciais e capim citronela no controle de larvas de *Aedes aegypti*. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. v. 10. n. 2. p.101-105, 2015.

WANG, T. P.; SHRIVASTAVA, J.; JOHANSEN, M. V.; ZHANG, S. Q.; WANG, F. F.; WEBSTER, J. P. Does multiple hosts mean multiple parasites? Population genetic structure of *Schistosoma japonicum* between definitive host species. **International journal for parasitology**, v. 36, n. 12, p. 1317-1325, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report of the WHO informal meeting on use of triclabendazole in fascioliasis control. WHO headquarters, Geneva,

Switzerland 17–18 October 2006, World Health Organization, Geneva [online] Available

at: [http://www.who.int/neglected\\_diseases/preventive\\_chemotherapy/WHO\\_CD\\_S\\_NTD\\_PCT\\_2007.1.pdf](http://www.who.int/neglected_diseases/preventive_chemotherapy/WHO_CD_S_NTD_PCT_2007.1.pdf). Acesso em: 17 mai 2017.

XIMENES, T.; RONDELAUD, D.; MAGE, C.; CHERMETTE, R. A eliminação da *Lymnaea truncatula* das pastagens: controle biológico e controle integrado contra a fasciolose. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre: edição extra, n.1, p. 4046, 1995.

ZAIDEN, M.F.; SANTOS, B. M. O.; CANO, M. A. T.; NASCIF JÚNIOR, L. A. N. Epidemiologia das parasitoses intestinais em crianças de creches de Rio Verde - GO. **Medicina**. Ribeirão Preto, v. 41, n.2, p. 182-187, 2008.